

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**KARMEN PANGERŠIČ**

**DIPLOMSKA NALOGA  
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ  
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE**

**LJUBLJANA, 2012**

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**KARMEN PANGERŠIČ**

**PRIMERJAVA DVEH METOD ZA DOKAZOVANJE SPECIFIČNIH PROTITELES  
PROTI VIRUSU EPSTEIN BARR**

**COMPARISON OF TWO METHODS FOR THE DETECTION OF SPECIFIC  
ANTIBODIES AGAINST THE EPSTEIN BARR VIRUS**

**LJUBLJANA, 2012**

Diplomsko naložbo sem opravljala v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca., dr. med.

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Član diplomske komisije: asist. Nejc Horvat, mag. farm.

### **Zahvala**

Za pomoč pri izdelavi diplomske naloge se za strokovno usmerjanje in nasvete zahvaljujem mentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, ki ste mi omogočili nastanek tega dela, še posebej gospe Tanji za pomoč pri praktični izvedbi diplomskega dela.

Nazadnje pa se moram zahvaliti tudi družini, ki mi je ves čas študija stala ob strani in me na tej poti podpirala.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc.dr. Miroslava Petrovca, dr. med.

Ljubljana, marec 2012

Karmen Pangeršič

## KAZALO

<b>POVZETEK .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IV</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV.....</b>	<b>V</b>
<b>SEZNAM SLIK.....</b>	<b>VIII</b>
<b>SEZNAM PREGLEDNIC.....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 TAKSONOMSKA RAZVRSTITEV VIRUSA EBV .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 ZGRADBA VIRUSA .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 RAZMNOŽEVANJE VIRUSA .....</b>	<b>4</b>
1.1.1. Razmnoževalni cikel .....	4
<b>1.4 VIRUSNI GENOM .....</b>	<b>6</b>
<b>1.5 ANTIGENSKE ZNAČILNOSTI VIRUSA .....</b>	<b>7</b>
1.5.1 Beljakovine latentne stopnje .....	8
1.5.2 Beljakovine litične stopnje .....	8
1.5.3 Vzpostavitev nesmrtnosti celice .....	9
<b>1.6 PATOGENEZA .....</b>	<b>10</b>
1.6.1 Primarna okužba z EBV .....	11
1.6.2 Latentna okužba z EBV .....	12
<b>1.7 IMUNSKI ODZIV .....</b>	<b>14</b>
1.7.1 Humoralni imunski odziv .....	15
1.7.2 Celični imunski odziv .....	16
<b>1.8 BOLEZNI, POVEZANE Z VIRUSOM EPSTEIN-BARR .....</b>	<b>17</b>
1.8.1 Infekcijska mononukleoza .....	18
1.8.1.1 Infekcijska mononukleoza pri otrocih in starejših .....	18
1.8.1.2 Infekcijska mononukleoza v nosečnosti .....	19
1.8.1.3 Infekcijska mononukleoza pri imunsko oslabljenih osebah .....	19
<b>1.9 EPIDEMILOGIJA.....</b>	<b>19</b>
1.9.1 Razširjenost v Sloveniji.....	19

<b>2</b>	<b><i>LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA</i></b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Serološka diagnostika okužb z EBV</b>	<b>20</b>
2.1.1	Dokazovanje heterofilnih protiteles	20
2.1.2	Dokazovanje specifičnih protiteles	20
<b>3</b>	<b><i>NAMEN DELA</i></b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b><i>MATERIALI IN METODE</i></b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Vzorci</b>	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>METODE</b>	<b>25</b>
4.2.1	PRINCIP METODE CLIA	25
4.2.1.1	Vrednotenje rezultatov za Liaison	26
4.2.2	METODA ELFA Z ANALIZATORJEM miniVIDAS	27
4.2.2.1	Laboratorijska oprema in reagenti	27
4.2.2.2	Vsebnost kompletov	28
4.2.2.3	Prostorčki v reagenčnih posodicah	30
4.2.3	Ostale aparature in pripomočki	31
<b>4.3</b>	<b>Postopek laboratorijskega dela</b>	<b>32</b>
4.3.1	Priprava vzorcev	32
4.3.2	VIDAS PTC protokol vnosa podatkov	32
4.3.3	Vnos umeritvene krivulje	32
4.3.4	Kalibracija	32
4.3.5	Postopek analize	32
4.3.6	Vrednotenje rezultatov za miniVIDAS	34
4.3.7	Vrednotenje rezultatov glede na status okužbe	34
4.3.8	Izračun diagnostične občutljivosti, specifičnosti in napovedne vrednosti testov	35
<b>5</b>	<b><i>REZULTATI</i></b>	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b>Primerjava rezultatov med testoma Liason in miniVIDAS</b>	<b>37</b>
<b>5.2</b>	<b>Rezultati skladnosti metod na podlagi serološkega statusa okužbe</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b><i>RAZPRAVA</i></b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b><i>SKLEPI</i></b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b><i>LITERATURA</i></b>	<b>47</b>

## POVZETEK

Virus Epstein-Barr (EBV) ali človeški herpes virus 4 je član družine herpes virusov. Najbolj je poznan kot vzrok za infekcijsko mononukleoizo, povezujejo pa ga tudi z Hodgkinovim limfomom, Burkittovim limfomom, nazofaringealnim karcinomom in drugimi limfoproliferativnimi boleznimi. Izraz »mononukleoza« se nanaša na povečanje števila limfocitov v krvnem obtoku. Najpogosteje analize za diagnosticiranje primarne okužbe z EBV obsegajo serološke metode dokazovanja protiteles. Paciente s klasičnimi kliničnimi znaki lahko diagnosticiramo z dokazom heterofilnih protiteles s Paul-Bunnellovo reakcijo.

V diplomskem delu smo želeli ugotoviti specifični serološki odziv na okužbo z virusom EBV z encimsko imunskim fluorescentnim testom (ELFA) in z uporabo analizatorja miniVIDAS ter s kemiluminiscenčno metodo (CLIA) z uporabo analizatorja Liaison. Rezultate metode ELFA smo primerjali z rezultati metode CLIA glede na posamezni parameter in skupno na interpretacijskem nivoju opredelitve okužbe.

V raziskavo smo vključili 109 vzorcev bolnikov s sumom na okužbo z virusom EBV. Primerjava skladnosti med rezultati sistemov miniVIDAS in Liaison je pokazala, da je bilo ujemanje največje pri parametru VCA/EA IgG (94,5 %) in EBNA IgG protitelesih (93,6 %), manjše pa pri parametru VCA IgM (89,0 %).

## ABSTRACT

The Epstein Barr virus (EBV) or human herpes virus 4 is a member of the herpes virus family. It is best known as the cause of infectious mononucleosis and it is also associated with Hodgkin's lymphoma, Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma and other lymphoproliferative diseases. The term "mononucleosis" refers to an increase of the lymphocytes in the bloodstream. The most commonly used diagnostic methods for the primary infection with EBV are serological methods. Patients with classical clinical signs can be diagnosed with the detection of heterophile antibodies using the Paul-Bunnell test.

The purpose of the present study was to determine the serological response with enzyme-linked fluorescence assay (ELFA), using the miniVIDAS analyzer and chemiluminescence immunoassay (CLIA), and using the Liaison analyzer. The results of ELFA method were compared with the results of the CLIA method.

Our research included 109 samples with suspected infection. We compared the concordance between VIDAS and Liaison. A high concordance was proven with VCA/EA IgG 94,5 % antibodies and EBNA IgG 93,6 % antibodies as with VCA IgM 89,0 % antibodies.

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>BL</b>	Burkittov limfom (angl.: <i>Burkitt's lymphoma</i> )
<b>BSA</b>	goveji serumski albumin (ang.: <i>bovine serum albumin</i> )
<b>CLIA</b>	kemiluminiscečni test (ang.: <i>chemiluminescence immunoassay</i> )
<b>CD</b>	označevanje celične površinske molekule z monoklonskimi protitelesi (ang.: <i>cluster of differentiation</i> )
<b>CD21/CR2</b>	membranski glikoprotein na limfocitih B (ang.: <i>Human complement receptor type 2</i> )
<b>CD19</b>	encim za prenos signalov z receptorja CR2 v celice
<b>CD40</b>	integralni membranski protein na membrani limfocitov B
<b>CD4</b>	monoklonska protitelesa CD4 se specifično vežejo s proteini, ki jih na svojih površinah izraža del limfocitov T, ki jih imenujemo celice pomagalke
<b>CD8</b>	monoklonska protitelesa CD8 specifično prepoznavajo proteine, ki jih na svojih površinah izražajo citotoksični limfociti T
<b>cDNA</b>	komplementarna DNA (ang.: <i>complementary DNA</i> )
<b>D</b>	razpršeni fragmenti (ang.: <i>diffuse</i> )
<b>DNK/DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina (ang.: <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>ds</b>	dvojno-vijačna (ang.: <i>double-stranded</i> )
<b>E</b>	zgodnji (ang.: <i>early</i> )
<b>EA</b>	zgodnji antigen (ang.: <i>early antigen</i> )
<b>EBV</b>	Epstein-Barr virus
<b>EBER</b>	RNA, ki jo kodira EBV (ang.: <i>Epstein-Barr encoded RNA</i> )
<b>EBNA</b>	Epstein-Barr jedrni antigen (ang.: <i>Epstein-Barr nuclear antigen</i> )
<b>ELFA</b>	encimsko imunski fluorescenčni test (ang.: <i>enzyme-linked fluorescence assay</i> )
<b>ELISA/EIA</b>	encimsko-imunski test (ang.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>Fab</b>	monovalentni fragment imunoglobulina, ki nastane po cepljenju s pepsinom (ang.: <i>fragment antigen-binding</i> )
<b>HB</b>	Hodgkinova bolezen
<b>HHV</b>	človeški herpes virus (ang.: <i>human herpes virus</i> )
<b>HLA-DR</b>	MHC razreda II (ang.: <i>transmembrane human major histocompatibility complex 2</i> )
<b>Hsp70</b>	protein vročinskega udara 70 (ang.: <i>Heat shock protein 70</i> )

<b>gp</b>	glikoprotein
<b>IE</b>	predčasni (ang.: <i>immediate early</i> )
<b>IFA</b>	posredna imunofluorescenčna metoda (ang.: <i>immunofluorescent assay</i> )
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon $\gamma$
<b>IL</b>	interlevkin
<b>IM</b>	infekcijska mononukleoza
<b>IgG</b>	imunoglobulin G (tudi A in M)
<b>IR</b>	notranje ponovitve (ang.: <i>internal repeats</i> )
<b>kbp</b>	kilo bazni par
<b>L</b>	pozni (ang.: <i>late</i> )
<b>LMP</b>	latentni membranski protein (ang.: <i>latent membrane protein</i> )
<b>MA</b>	matriks protein
<b>MHC</b>	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (ang.: <i>major histocompatibility complex</i> )
<b>MLE</b>	kartica z umeritveno krivuljo (ang.: <i>mastre lot entry</i> )
<b>mRNA</b>	informacijska RNA (ang.: <i>messenger RNA</i> )
<b>miRNA</b>	kratka molekula RNA ( <i>microRNA</i> )
<b>NK</b>	naravna celica ubijalka (ang.: <i>natural killer cell</i> )
<b>NPC</b>	nazofaringealni karcinom (ang.: <i>nasopharyngeal carcinoma</i> )
<b>nm</b>	nanometer
<b>OPR</b>	odprtji bralni okvir (ang.: <i>open reading frame</i> )
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo (ang.: <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>pH</b>	merilo za koncentracijo prostih pozitivnih vodikovih ionov v raztopini (ang.: <i>potential Hydrogen</i> )
<b>PTC</b>	primarna tarčna komora (ang.: <i>Primary Target Chamber</i> )
<b>R</b>	omejeni fragmenti (ang.: <i>restricted</i> )
<b>RNA/RNK</b>	ribonukleinska kislina (ang.: <i>ribonucleic acid</i> )
<b>Rta</b>	podvojevalni in prepisovalni aktivator (ang.: <i>Replication and Transcription Activator</i> )
<b>Th1</b>	tip 1 celic pomagalk limfocitov T (ang.: <i>type 1 of T helper cells</i> )
<b>TR</b>	terminalne ponovitve (ang.: <i>terminal repeats</i> )
<b>SPR</b>	pipetni nastavek s trdno fazo (ang.: <i>solid phase receptacle</i> )
<b>U</b>	edinstvene ponovitve (ang.: <i>unique</i> )
<b>UV</b>	ultravijolično valovanje

<b>VCA</b>	virusni kapsidni antigen (ang.: <i>viral capsid antigen</i> )
<b>VCAG</b>	virusni kapsidni antigen/ zgodnji antigen IgG (VCA/EA IgG)
<b>VCAM</b>	virusni kapsidni antigen IgM (VCA IgM)
<b>WB</b>	Western blot
<b>Zta</b>	osnovni levcinski zadrga transkripcijski faktor (ang.: <i>the viral bZIP transcription factor</i> )

## SEZNAM SLIK

Slika 1: Shematski prikaz zgradbe EBV v prerezu.....	4
Slika 2: Prikaz razmnoževalnega cikla EBV v litičnem (produktivnem) ciklu.....	5
Slika 3: Shematski prikaz genoma EBV v obliki episoma (a) in v linearni obliki (b) .....	6
Slika 4: Linearna prikaz genoma EBV s prikazom odprtih okvirjev glavnih litičnih in latentnih genov .....	7
Slika 5: Ekspresija genov EBV in cikel celičnih dogodkov v limfocitih B (12).....	10
Slika 6: Shematski prikaz patogeneze okužbe z EBV .....	11
Slika 7: Shematski prikaz primarne okužbe (6) .....	12
Slika 8: Shematski prikaz latentne okužbe (6) .....	13
Slika 9: Shematski prikaz humoralne in celične imunosti.....	14
Slika 10: Imunološki odgovor na EBV okužbo s protitelesi (12) .....	15
Slika 11: Primerjava starosti posameznikov v različnih populacijah, ki se okužijo z EBV (19) .....	19
Slika 12: Princip metode CLIA. ....	26
Slika 13: Shematski prikaz poteka metode »sendvič« ELFA v SPR-ju .....	27
Slika 14: Analizator miniVIDAS .....	28
Slika 15: Shematski prikaz reagenčnih posodic za aparat miniVIDAS in njegove komponente .....	30
Slika 16: Shematski prikaz avtomatiziranega dela, ki poteka v analizatorju miniVIDAS .....	33
Slika 17: Število preiskovancev v posamezni starostni skupini .....	36
Slika 18: Skladnost med metodo ELFA (miniVIDAS) in CLIA (Liaison) glede na status okužbe .....	39
Slika 19: Primerjava seroloških statusov, ugotovljenih z metodama miniVIDAS in Liaison glede na starostno skupino pacientov.....	42

## SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Taksonomska razvrstitev človeških herpesvirusov (4) .....	2
Preglednica II: Taksonomska razvrstitev človeških herpesvirusov (4) .....	3
Preglednica III: Beljakovine latentne stopnje in njihova vloga (11) .....	8
Preglednica IV: Beljakovine litične stopnje in njihova funkcija (11) .....	9
Preglednica V: Serološki profil okužb z EBV (4) .....	16
Preglednica VI: Malignomi, značilni za okužbo z EBV (18).....	18
Preglednica VII: Diagnostične metode za dokazovanje okužbe z EBV (22).....	22
Preglednica VIII: Diagnostične metode za dokazovanje okužbe z EBV (22).....	23
Preglednica IX: Interpretacija mejnih vrednosti rezultatov kemiluminiscenčnega testa Liaison (23) .....	26
Preglednica X: Vsebnost diagnostičnih kompletov reagentov s 30 testnimi reagenčnimi posodicami za EBV VCA/EA IgG (25) .....	28
Preglednica XI: Vsebnost diagnostičnih kompletov reagentov s 30 testnimi reagenčnimi posodicami za EBV VCA IgM (26).....	29
Preglednica XII: Vsebnost diagnostičnih kompletov reagentov s 30 testnimi reagenčnimi posodicami za EBV EBNA IgG (24) .....	29
Preglednica XIII: Opis vsebine reagenčnih posodic za VCAG (25).....	30
Preglednica XIV: Opis vsebine reagenčnih posodic za VCAM (26) .....	31
Preglednica XV: Opis vsebine reagenčnih posodic za EBNA (24).....	31
Preglednica XVI: Interpretacija mejnih vrednosti rezultatov encimsko fluorescenčnega imunskega testa miniVIDAS (Bio Merieux) (24). ....	34
Preglednica XVII: Serološki status okužbe z EBV na podlagi specifičnih protiteles (27) .....	35
Preglednica XVIII: Primerjava števila in deleža pozitivnih, negativnih in mejnih vrednosti za testirane vzorce.....	37
Preglednica XIX: Primerjava (ujemanje, občutljivost, specifičnost) rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles proti EBV s testoma Liaison in miniVIDAS .....	37
Preglednica XX: Skladnost rezultatov serološkega statusa v primerjavi testa miniVIDAS s testom Liaison .....	40
Preglednica XXI: Prikaz neskladnih rezultatov testov miniVIDAS in Liaison .....	41

## 1 UVOD

Virus Epstein-Barr (EBV) je bil poimenovan po Anthonyu Epsteinu in Yvonne Barr, ki sta prva opisala virus v celicah tumorja pacienta z Burkittovim limfomom leta 1964. (1) Prekuženost z EBV je v populaciji 80-100%. Virus se pri okuženih osebah nahaja v limfocitih B. Primarna okužba z EBV v otroštvu je večinoma asimptomatska, v adolescenci in pri odraslih pa pogosto poteka simptomatsko, kot infekcijska mononukleoza. Virus se večinoma prenaša s slino in poljubljanjem (2).

Serološke metode so še vedno metode izbora za diagnosticiranje primarnih okužb z EBV. Za paciente s klasičnimi kliničnimi znaki diagnosticiramo heterofilna protitelesa po metodi Paul-Bunnell. Približno 15 do 20 % pacientov, okuženih z EBV in z znaki infekcijske imunonukleoze, nima heterofilnih protiteles, zato v diagnostične namene dokazujemo protitelesa proti antigenom virusa EBV, ki jih delimo na z litičnim ciklom povezane antigene in na tiste, ki nastanejo v latentnem ciklu (3).

Dokler večina virusnih delcev vstopa v litični cikel, se sintetizirajo antigeni kapside (VCA) in zgodnji antigeni (EA) difuzne (D) ali restriktivne (R) komponente. Ko virus vstopi v latentni cikel, pa se sintetizira kompleks jedrnega antigena (EBNA). Organizem se odzove na antigene s specifičnimi protitelesi, ki jih v diagnostiki uporabljam, kot klinične pokazatelje (3).

## 1.1 TAKSONOMSKA RAZVRSTITEV VIRUSA EBV

Herpesvirusi so med najpogostejšimi povzročitelji okužb pri človeku. Virusi, ki pripadajo tej družini, imajo posebno biološko lastnost, da po okužbi ostanejo trajno prisotni v organizmu, občasno pa lahko povzročijo bolezni (3).

Na osnovi njihovega celičnega tropizma, citopatskega učinka v celičnih kulturah in mesta latenze oziroma perzistence v gostitelju herpesviruse razdelimo v tri poddružine (Preglednica I in Preglednica II) (3).

**Preglednica I:** Taksonomska razvrstitev človeških herpesvirusov (4)

Poddružina	rod	vrsta	pogosto poimenovanje	okrajšava	biološke značilnosti
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	človeški herpesvirus 1	virus herpes simpleks tip 1	HSV-1 (HHV-1)	• kratek replikacijski ciklus, citolitični • perzistirajo latentno v telesih aferentnih nevronov v možganskih ali hrbtenjačnih ganglijih
		človeški herpesvirus 2	virus herpes simpleks tip 2	HSV-1 (HHV-2)	
	<i>Varicellovirus</i>	človeški herpesvirus 3	virus varičelezostra	VZV (HHV-3)	
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	človeški herpesvirus 5	virus citomegalije	CMV (HHV-5)	• dolg replikacijski ciklus, v celičnih kulturah vodijo do povečanja gostiteljskih celic (megalocitov) • perzistirajo v limfocitih B in T, monocitih/makrofagih, nevronih ter epitelnih celicah
	<i>Roseolovirus</i>	človeški herpesvirus 6 človeški herpesvirus 7	človeški herpesvirus 6 človeški herpesvirus 7	HHV-6 HHV-7	

**Preglednica II:** Taksonomska razvrstitev človeških herpesvirusov (4)

poddružina	rod	vrsta	pogosto poimenovanje	okrajšava	biološke značilnosti
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	človeški herpes virus 4	virus Epstein-Barr	EBV (HHV-4)	• limfoproliferativni • perzistirajo v limfocitih B in T
		človeški herpes virus 8	virus Kaposijevega sarkoma	HHV-8	

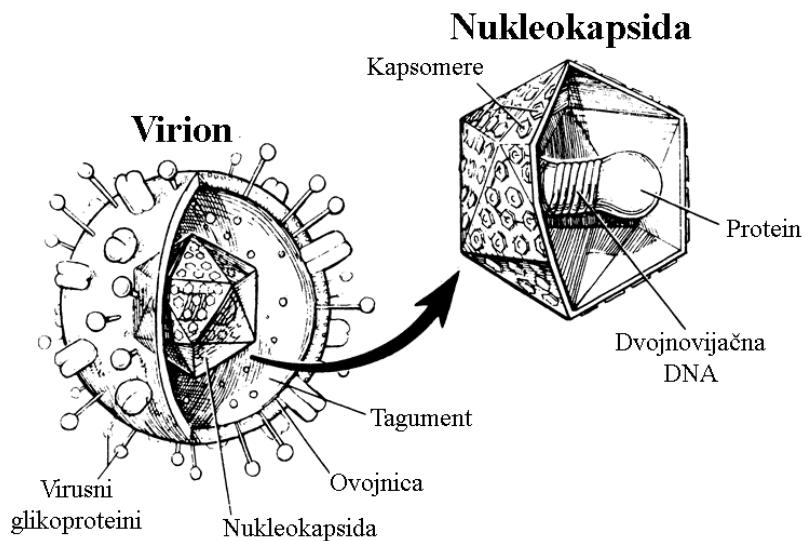
Virus Epstein-Barr (EBV), ki ga uvrščamo v družino herpesvirusov, je med najbolj razširjenimi človeškimi virusi, saj ima specifična protitelesa več kot 90 % odraslih prebivalcev (5).

Virus Epstein-Barr (EBV; Human herpes virus 4 ali HHV-4) je del rodu *Lymphocryptovirus* (limfokriptovirusi), ki spada v limfotropno poddružino *Gammaherpesvirinae* (gamaherpesvirusi), ki je del družine *Herpesviridae* (herpesvirusi) (6).

## 1.2 ZGRADBA VIRUSA

Virus Epstein-Barr je virus z genomom DNK. Gostota virusa v cezijevem gradientu je 1,2-1,3 in ima molekulsko maso  $100 \times 10^6$ . Ovojnica zrelega viriona ima premer 150-200 nm, ki nastane iz celične membrane pri brstenju virusa in je bistvena za infektivnost virusa (7).

Beljakovinsko regijo med nukleokapsido in membransko ovojnico imenujemo tegument. Struktura viriona zajema osrednji del, ki ima obliko ikozaedrične kapside in jo imenujemo nukleokapsida. V njej je dvojno-vijačni DNK genom s približno 184 kb (Slika 1). Nukleokapsida je sestavljena iz 162 trikotnih kapsomer s premerom 100 nm. Analiza virionov je z masno spektrometrijo opredelila šest kapsidnih virusnih beljakovin, dvanajst glikoproteinov in kar 17 tegumentnih beljakovin (1).



Slika 1: Shematski prikaz zgradbe EBV v prerezu

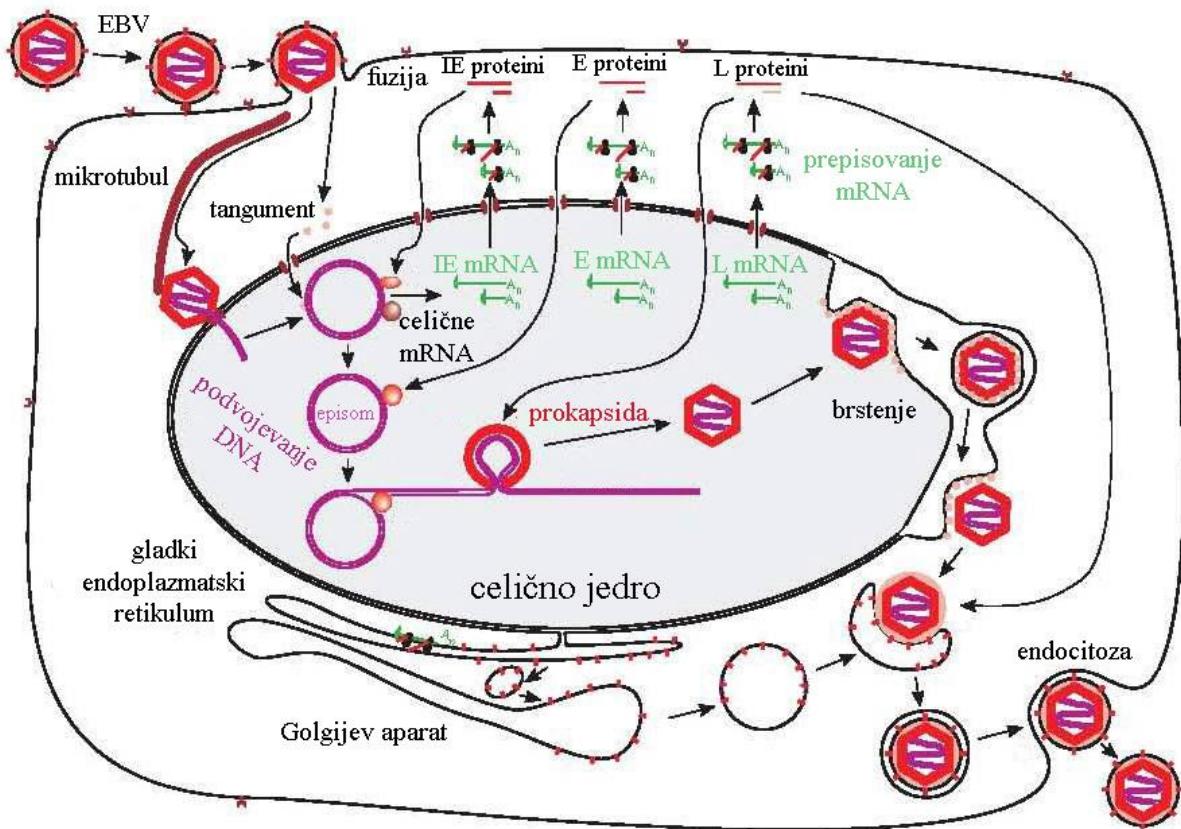
### 1.3 RAZMNOŽEVANJE VIRUSA

Virus se ob okužbi veže na specifične receptorje in nato okuži limfocite B (redkeje limfocite T, dendritične celice in makrofage). Primarna okužba aktivira limfocite B in vodi v proliferacijo, stimulacijo in tvorbo imunoglobulinov, lahko pa povzroči tudi transformacijo celic. Virusni genom običajno ostane kot episom (zunaj kromosomski plazmid) in se replicira ob vsaki delitvi celice (3).

Redkeje, zlasti v transformiranih celicah, pride do integracije virusnega genoma v celični dedni material. Z okužbo limfocitov B se virus uspešno izogne imunskemu sistemu in izločitvi iz telesa. V večini primerov ostane virus v latentni obliki v limfocitih (2).

#### 1.1.1. Razmnoževalni cikel

Virus najpogosteje vstopa v celice skozi ustno-žrelni prostor preko epitelijskih celic. Prehaja v ustni del žrela, kjer se veže glavni virusni glikoprotein gp350 na receptor CD21 (znan tudi kot receptor komplementa CR2) in okuži limfocite B (4). Pride do pH-neodvisne fuzije membrane, ki omogoča vstop delcev EBV v celico. Po vstopu virusa se EBV razstavi in tegumentni proteini se sprostijo, kar povzroči izklop sinteze beljakovin v celici. Nukleokapsida sprosti virusni genom v jedro prek jadrne pore, kjer se vzpostavi latenca (8). Ta proces asociira z aktivacijo, proliferacijo in imortalizacijo latentno okuženih celic B. Prek virusne kaskade se začne predčasna ekspresija (IE ang.: *immediate early*) genov. Sledi zgodnja (E ang.: *early*) in pozna (L ang.: *late*) ekspresija (Slika 2) (9).

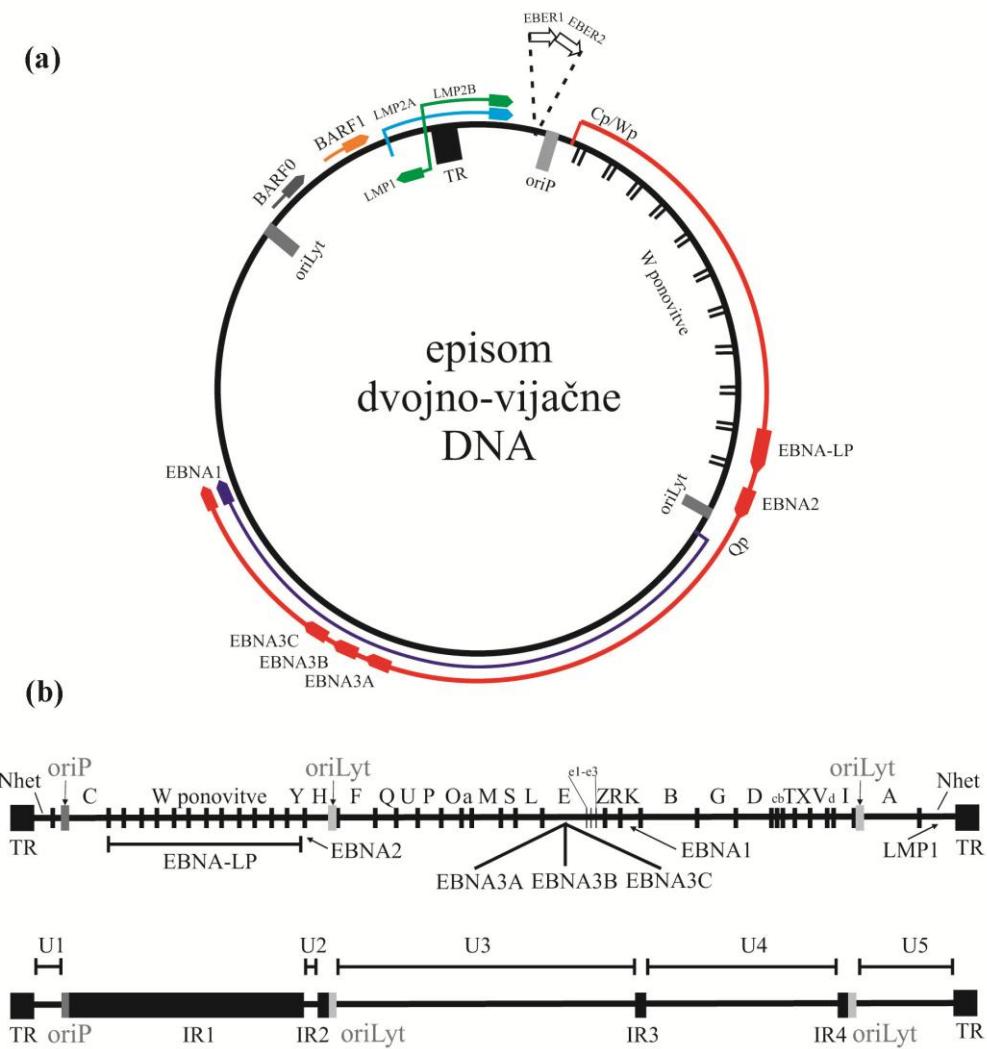


Slika 2: Prikaz razmnoževalnega cikla EBV v litičnem (produktivnem) ciklu.

Na splošno IE in E beljakovine prispevajo k izražanju genov in podvajjanju DNK, pozne beljakovine pa so bodisi strukturne komponente viriona ali imajo pomembno vlogo pri izgradnji in izstopu virionov (9).

Virioni z brstenjem skozi jedrno membrano potujejo na površino celice v mešičkih endoplazemskega retikuluma, kjer izstopijo iz celice z endocitozo (9).

## 1.4 VIRUSNI GENOM



**Slika 3:** Shematski prikaz genoma EBV v obliki episoma (a) in v linearni obliki (b)

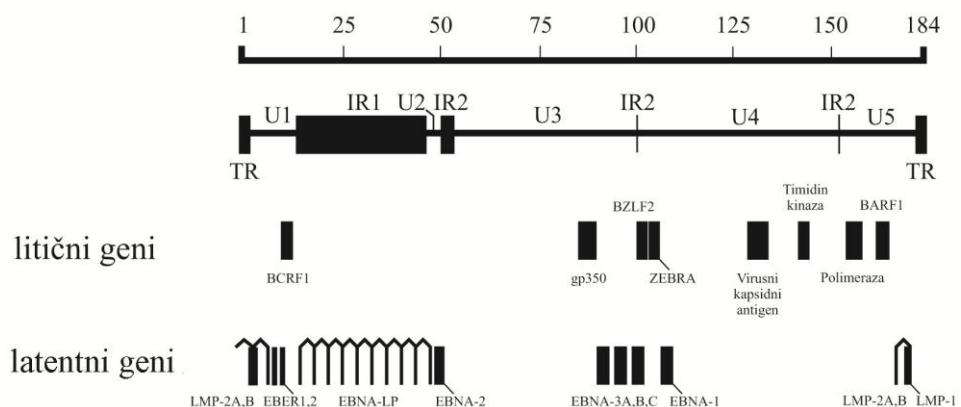
Genom EBV (slika 3) je episom dvojno vijačne (ds) DNK (a) ali v linearni obliki (b), dolga približno 184 kbp. V linearni konfiguraciji, kot v virionu, je na obeh straneh povezan z variabilnim številom 538 bp neposredno na TR (ang.: *terminal repeats*). Genom je razdeljen v kratke 12 kbp in dolge 134 kbp z večinoma edinstvenim U (ang.: *unique*) nizom domen, po sedem do deset kopij 3 kbp notranjih ponovitev IR1 (ang.: *internal repeats*). Poleg tega je dolga domena razdeljena na štiri krajše domene (U2-U5) zaradi ponavljajočih se elementov, ki vsebujejo kratke neposredne ponovitve (IR2-IR4). Vsaka od podarjenih ponovitev prispeva h kodiranju informacije za virusne beljakovine (1).

Na podlagi identifikacije potencialnih translacijskih odprtih bralnih okvirjev ORF (ang.: *open reading frames*) je bil predviden obstoj približno 75 genov iz genomskega zaporedja nukleotidov B95-8 izolatov EBV. Zaporedje analiz cDNA EBV je opredelilo dodatne gene, ki niso bili razvidni iz genomskega zaporedja zaradi zelo spojene narave njihove mRNA. Tako je zdaj po ocenah 80 do 85 beljakovin EBV, čeprav vse še niso potrjene. Poleg teh izraža EBV dva razreda nekodirajočih RNA: EBV kodirane majhne RNA (EBER) 1 in 2, ki so zelo strukturirane RNA iz 167 in 172 nukleotidov, oziroma skupino mikro RNA (miRNA), ki izhajajo iz dveh različnih lokusov (1).

Pri ljudeh povzročata okužbo dva tipa EBV. Med seboj se razlikujeta predvsem v zaporedju latentnih genov. Limfociti B se hitreje spremenijo z EBV-1 kot celice, okužene z EBV-2, na kar vpliva EBV jedrni antigen EBNA-2 (1). Poleg tega je različne seve EBV možno prepoznati po razliki v številu ponovitev znotraj genoma. Več kot 95 % izolatov EBV v ZDA, Evropi in Jugozahodni Aziji pripada tipu EBV-1 (8).

## 1.5 ANTIGENSKE ZNAČILNOSTI VIRUSA

Antigene virusa Epstein-Barr delimo na tiste, ki so povezani z litičnim (produktivnim razmnoževanjem) ciklom, in na tiste, ki so del aktivnega dela genoma v latentnem ciklu (Slika 4) (10).



Slika 4: Linearna prikaz genoma EBV s prikazom odprtih okvirjev glavnih litičnih in latentnih genov

### 1.5.1 Beljakovine latentne stopnje

V latentnem ciklu se lahko izrazi le nekaj od 100 virusno specifičnih antigenov, ki so razdeljeni v dva glavna razreda (Preglednica III) (8):

- **LMP**, latentne membranske beljakovine (ang.: *latent membrane protein*); LMP-1, LMP-2A in LMP-2B
- **EBNA**, EBV jedrske antigene (ang.: *EBV nuclear antigen*); EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C in EBNA-LP (ang.: *leader protein*)

**Preglednica III:** Beljakovine latentne stopnje in njihova vloga (11)

Odprti bralni okvir	Beljakovina	Vloga
BKRF1	EBNA-1	vzdrževanje episoma, uravnavanje prepisovanja DNA
BYRF1	EBNA-2	uravnavanje virusnih in celičnih genov
BERF1	EBNA-3A	zaviranje delovanja EBNA-2, regulacija izražanja celičnih genov
BERF2	EBNA-3B	
BERF3/4	EBNA-3C	
BWRF1	EBNA-LP	povečuje dejavnost EBNA-2
BNLF1	LMP-1	preprečuje apoptozo in omogoča preživetje limfocitov B
BNRF1	LMP-2A/2B	vzdržuje latenco
EBER1/2		regulira prirojeno imunost

### 1.5.2 Beljakovine litične stopnje

EBV kodira približno 90 beljakovin, ki se izrazijo med razmnoževalnim ciklom. Po analogiji z drugimi herpesvirusi so ti razvrščeni kot predčasni, zgodnji in pozni proteini.

Predčasna gena BZLF1 (Zta) in BRLF1 (Rta) aktivirata delovanje zgodnjih genov in s tem vplivata na prehod iz latentne v litično okužbo. Zgodnji geni, celične linije Raji, ki izražajo zgodnje antigene EA (ang.: *early antigens*), so opredeljeni kot:

- razpršeni D (ang.: *diffuse*), obarvanje jedra in citoplazme
- omejeni R (ang.: *restricted*), obarvanje jedra

Večina ima funkcijo encimov, potrebnih za replikacijo DNA.

Pozne gene, kapsidne virusne beljakovine VCA (ang.: *virual capsid antigens*), sestavljajo neglikozilirane strukturne virusne beljakovine (Preglednica IV). Glavno beljakovino kodira BcLF1 iz odprtrega bralnega okvirja (12).

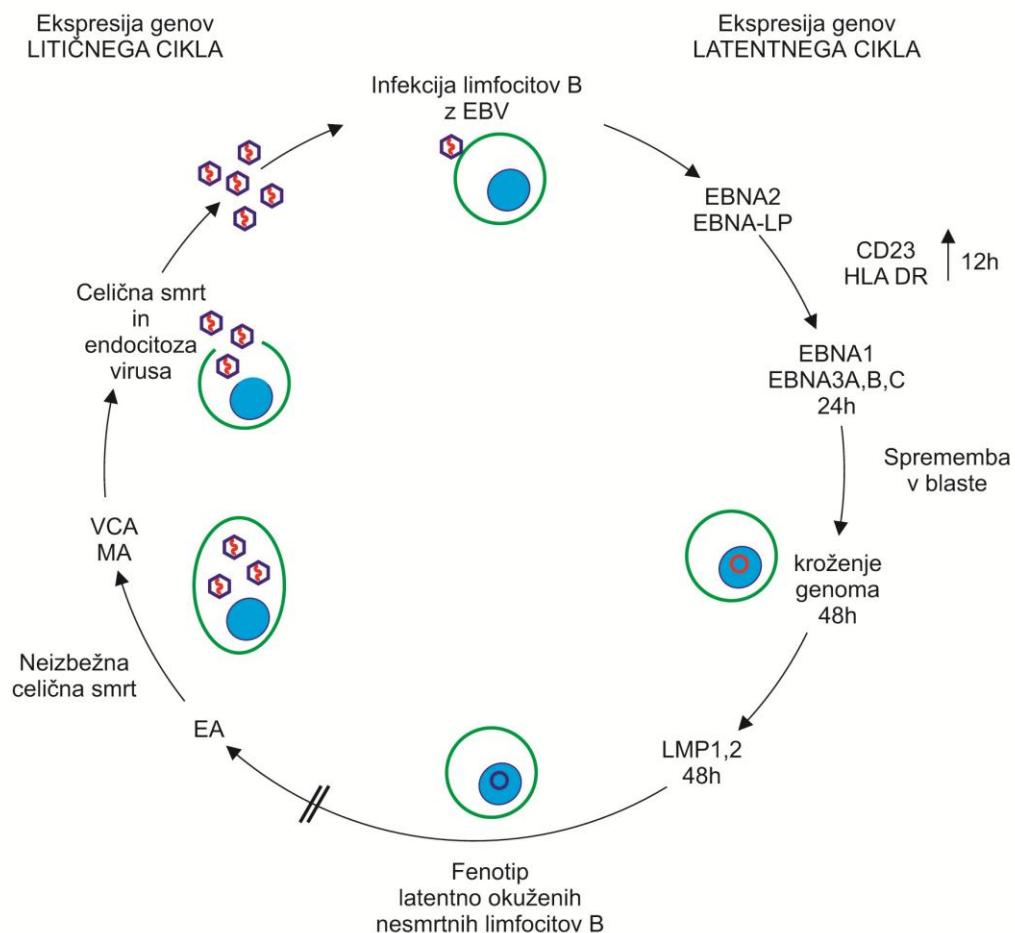
**Preglednica IV:** Beljakovine litične stopnje in njihova funkcija (11)

	odprtibralni okvir	protein	funkcija
predčasni geni	BZLF1	ZEBRA	transkripcijski aktivator litičnega cikla
	BRLF1		transkripcijski aktivator litičnega cikla
zgodnjigeni	BMRF1		transkripcijski aktivator
	BALF2		za vezavo DNA
	BALF5		DNA polimeraza
	BORF2		DNA replikacija ribonukleotid reduktaze
	BARF1		DNA replikacija ribonukleotid reduktaze
	BXLF1		timidin kinaza
	BGLF5		alkalna eksonukleaza
	BSLF1		Primaza
	BBLF4		Helikaza
	BKRF3		uracil DNA glikozilaza
pozni geni	BcLF1	VCA	glavni kapsidni antigen
	BLLF1	gp350/220	glavni ovojnični glikoprotein, veže CD21 na limfocite B
	BXLF2	gp85(gH)	fuzija celice in virusa
	BKRF2	gp25(gL)	fuzija ovojnice virusa z celico
	BZLF2	gp42	vezava MHC razreda I na limfocite B
	BALF4	gp110(gB)	glikoprotein B za vstop v celico
	BLRF1	gN	izstop virusa iz celice
	BBRF3	gM	izstop virusa iz celice

### 1.5.3 Vzpostavitev nesmrtnosti celice

Pri *in vitro* okužbi limfocitov B se celična aktivacija zgodi v roku 24 ur. Sprva majhni limfociti B so podvrženi blastogenezi, s povečanim izražanjem HLA-DR in povečanjem velikosti citoplazme in jedra ter aktiviranjem antigenov na površini celice. Še posebno se izrazi CD23, ki je bistven za nesmrtnost celic. Po 36 urah se začne sinteza DNA in delitev celic, ki poteka 72 ur. V roku 72 ur se v citoplazmi okuženih limfocitov lahko določi Ig (ang.: *immunoglobulin*), kjer prevladuje razred imunglobulinov IgM (12).

Te zgodnje spremembe v limfocitih B, okuženih z EBV, so podobne aktivatorjem CD40 ligandov, kar vodi do nesmrtnosti limfocitov B. EBNA-2 in EBNA-LP sta prva antivirusna antigena, ki se pojavita že v dvanaajstih urah po okužbi. Temu v 24 urah sledijo drugi jedrni antigeni EBNA (EBNA3A,B,C). LMP1 zaznamo približno 48 ur po okužbi (Slika 5) (12).



Slika 5: Ekspresija genov EBV in cikel celičnih dogodkov v limfocitih B (12)

## 1.6 PATOGENEZA

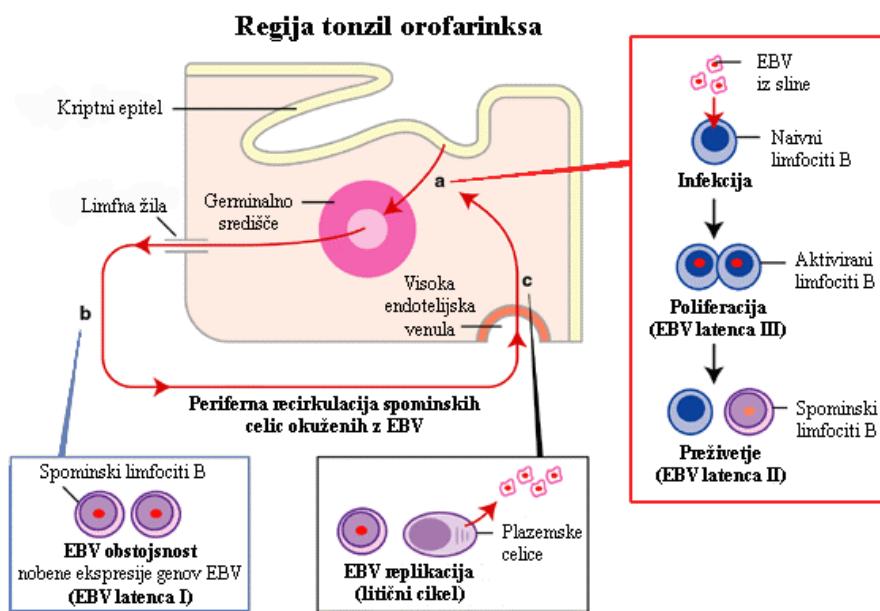
EBV vstopi v telo skozi usta, okužba se pojavi v ustnem delu žrela, od koder se kužni virusni delci izločajo v ustno votlino, kjer jih je mogoče dokazati.

EBV lahko okuži mnogo vrst celic v različnih okolišinah, vključno z limfociti T, celicami NK, celicami gladke mišičnine in folikularnimi dendritičnimi celicami, vendar sta limfocit B in epitelne celice dva poglavitna cilja (13).

Okužba z EBV se lahko izide tako, da (Slika 6) (4):

- se EBV razmnožuje v limfocitih B ali epitelijskih celicah žlezah slinavk, ki so dovezne za okužbo z virusom;
- EBV stimulira rast limfocitov B in prepreči njihovo smrt;
- po primarni okužbi vzpostavi latentno stanje v limfocitih B, kljub delajočim limfocitom T, ki nadzorujejo okužbo;
- imunski odgovor limfocitov T (limfocitoza) privede do IM.

Pritrditev EBV na limfocite B poteka z interakcijo med virusnim glikoproteinom gp350/gp220 in receptorjem komplementa tipa 2, CR2 ali CD21. Pritrditev EBV na površino limfocitov B z CR2 stimulira endocitozo virusnih veziklov. Za zlitje ovojnici z limfociti B v nizkem pH so potrebni štirje virusni proteini (gB, gH, gL in gp42) (14).



Slika 6: Shematski prikaz patogeneze okužbe z EBV

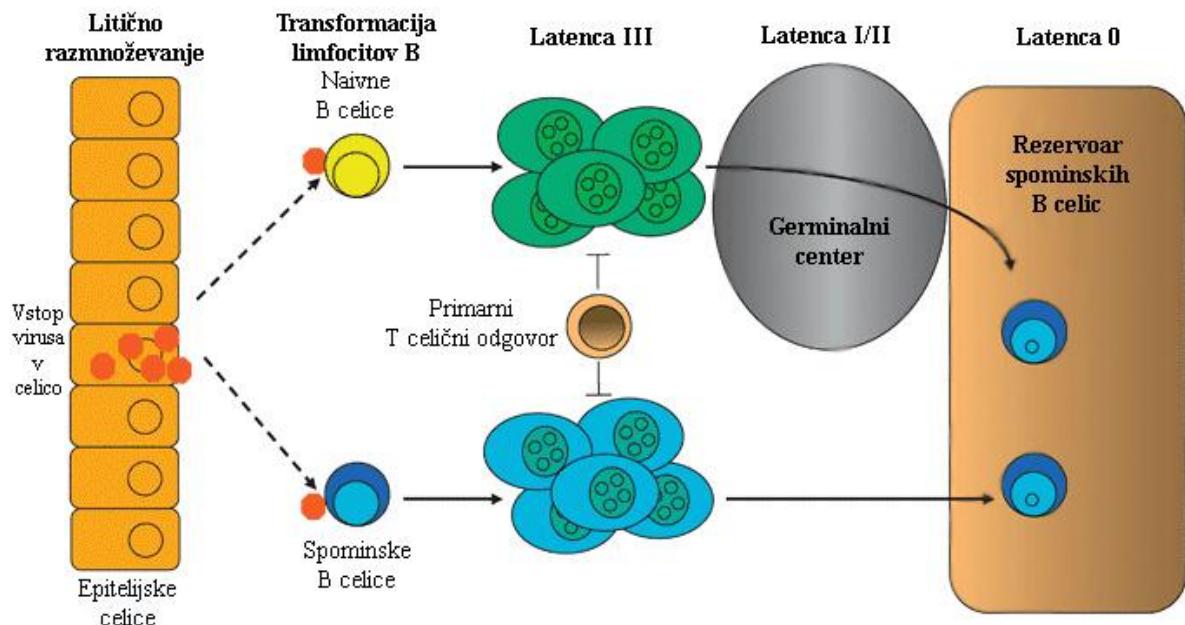
### 1.6.1 Primarna okužba z EBV

Pri primarni okužbi limfocitov B se aktivira proliferacija in tvorba imunoglobulinov, lahko pa povzroči tudi transformacijo celic (15). Virusni genom običajno ostane kot zunaj kromosomski plazmid in se replicira ob vsaki delitvi celice.

Z okuženjem limfocitov B se virus uspešno izogne celicam CD8 T, CD4 T in naravnim celicam ubijalkam NK (Slika 7) (8).

EBV izraža različne gene, da se izogne imunskemu odzivu, kot so BLLF1a/b, ki z vezavo gp350/220 glikoproteina na CR2 moti posredovano B celično stimulacijo. BNLF1 izzove ekspresijo LMP-1, kar povzroči zmanjšanje IL-12 in s tem povečano izločanje IL-27, ki je pomemben za celično preživetje (16). BCRF-1, homolog IL-10, omogoča pobeg z inhibiranjem celicam pomagalkam Th1 T, vključno z IFN- $\gamma$  in zgodnjo T celičnim odgovorom na virus med B celično rastjo in sintezo IgG (4).

V večini primerov ostane virus v latentni obliki v limfocitih B, do reaktivacije pa prihaja zlasti ob imunsko oslabljenih stanjih z oslabljeno celično imunostjo. Okuženi prenašalci razvijejo celično imunost proti mnogim, tako litičnimi kot latentnim beljakovinam (12).



Slika 7: Shematski prikaz primarne okužbe (6)

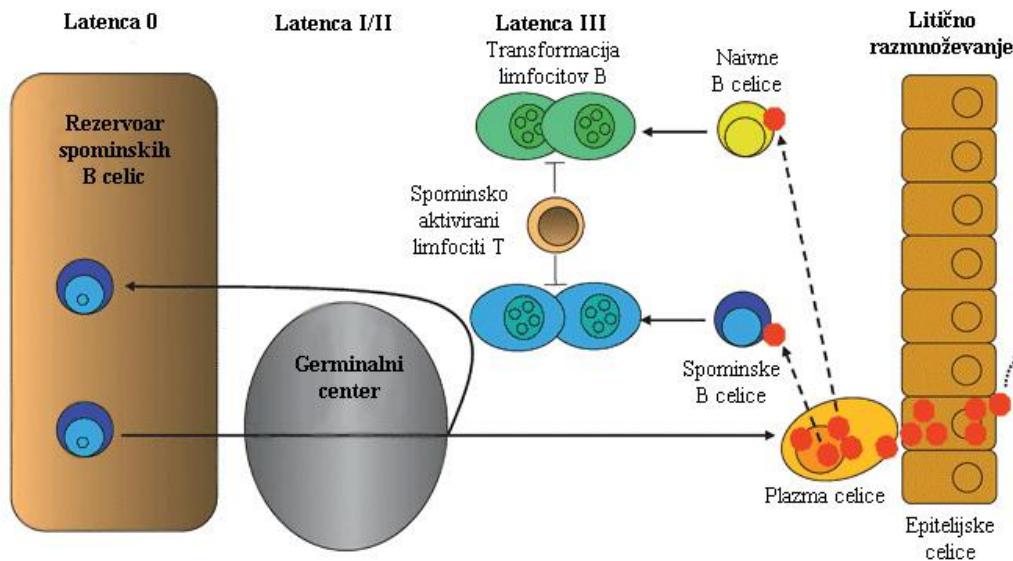
### 1.6.2 Latentna okužba z EBV

Po primarni okužbi in začetku virusnega razmnoževanja v epitelnih in limfoidnih celicah se vzpostavi latenca v podskupini CD19+ B celicah. Pri tem je pogosta vseživljenska asimptomatska faza. EBV genom miruje v spominskih B celicah, število okuženih celic je majhno in strogo nadzorovano z gostiteljevim celičnim in humorarnim imunskim odzivom. Izguba ravnovesja vodi do povečanja virusnega bremena, kar se pogosto zgodi pred začetkom malignih obolenj (14).

K širjenju okuženih limfocitov v germinalnem centru pripomoreta LMP-1 in LMP-2A, kot nadomestek za CD40 B celični signal. Kombinacija plazmacitoidnih diferenciacij lahko sproži začetek litičnega razmnoževanja in s tem zagotavlja nizko stopnjo izločanja virusa v orofarinks (Slika 8) (6).

Različne oblike latenc, ki so v povezavi z virusnimi malignimi, predstavljajo latentne programe (8):

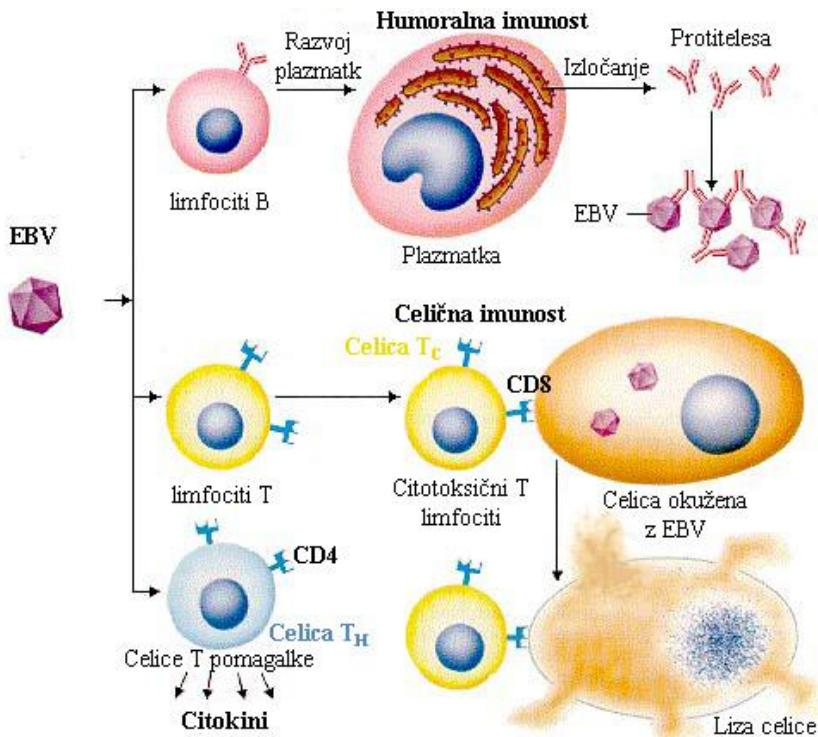
- v latenci 1; EBNA-1 je edini protein, ki se izrazi poleg EBER in BamHI prepisov. Ta vzorec izražanja genov je razviden iz tkiva bolnikov z Burkittovim limfomom;
- v latenci 2; EBNA-1, LMP-1 in LMP-2 se izrazijo z EBER in BamHI RNA. To je razvidno iz vzorca tkiva bolnikov z Hodgkinovo boleznijo, perifernim T celičnim limfomom in karcinomu nazofarinks;
- v latenci 3 so izraženi vsi z latenco povezani EBV proteini EBV, kot tudi EBER in BamHI RNA. Latenca 3 je razvidna iz z EBV okužbami povezanimi limfoproliferativnimi boleznimi, kot so infekcijske mononukleoza in EBV-preoblikovane limfoblastne celične linije;
- latenca 4 je prisotna v B-celicah, ki krožijo po periferni krvi. V latenci 4 se izražajo LMP-2 in v nekaterih primerih tudi EBNA-1.



Slika 8: Shematski prikaz latentne okužbe (6)

## 1.7 IMUNSKI ODZIV

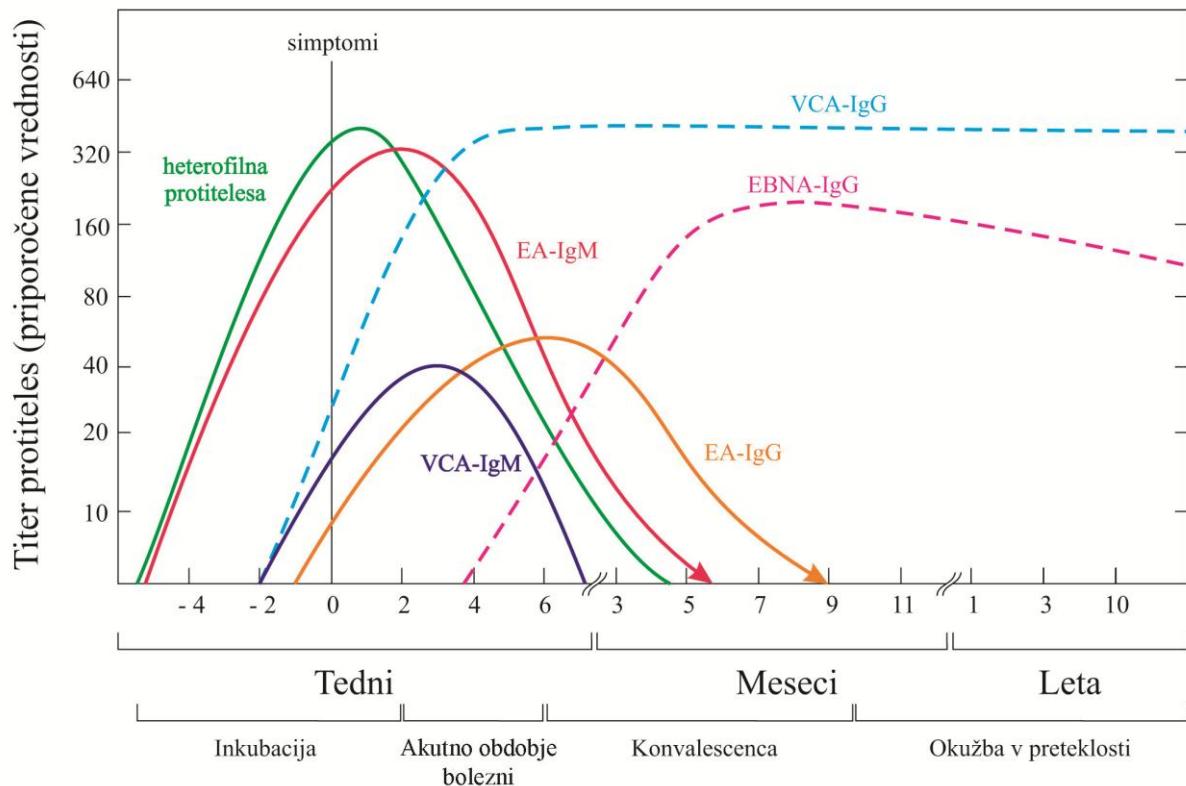
Za razvoj humorala posredovanega odziva so potrebne interakcije med različnimi tipi celic. To so predvsem limfociti T in B, v poznejši efektorski fazi pa tudi makrofagi in celice ubijalke NK (ang.: *natural killer*) (Slika 9) (17).



Slika 9: Shematski prikaz humorala in celične imunosti

### 1.7.1 Humoralni imunski odziv

Humoralni odgovor na virusne antigene je predstavljen na Slici 10:



**Slika 10:** Imunološki odgovor na EBV okužbo s protitelesi (12)

Serološko opredeljena protitelesa, ki jih sestavlja več antigenov, so (8):

- EBNA, šest različnih jedrnih beljakovin;
  - MA, ki se izraža na površini celic pozno v litičnem ciklu in vsebuje pretežno glikoprotein (gp350);
  - VCA, ki se izraža v celicah pozno v litičnem ciklu (BFRF3, BLRF2, BcLF1 in glikoprotein gp110);
  - EA, ki se izraža v celicah zgodaj v litičnem ciklu (BZLF1, BHRF1, BMLF1, BMRF1 in BALF2).

**Preglednica V:** Serološki profil okužb z EBV (4)

heterofilna protitelesa	VCA-IgM	VCA-IgG	EA-IgG	EBNA-IgG	razlaga
-	-	-	-	-	serološko negativen rezultat
+	+	+	±	-	akutna okužba
-	-	+	+	-	kronična okužba
-	-	+	-	+	konvalescenca
-	-	+	+	+	ponovna aktivacija

V času nastopa kliničnih znakov so v serumu prisotna anti-VCA IgG, EA in MA protitelesa. Protitelesa za virusne glikoproteine gp350 nevtralizirajo in aglutinirajo virusne delce, s čimer preprečijo nadaljnje širjenje okužbe in virusa. Anti-VCA IgM, anti-VCA IgA in anti-EA IgG protitelesa so najvišja v akutni fazi in najnižja ali nezaznavna v času okrevanja. IgG protitelesa anti-EBNA 1 navadno niso zaznavna v serumu do obdobja okrevanja (Preglednica V) (12).

### 1.7.2 Celični imunski odziv

Celično posredovana imunost ima pomembno vlogo pri nadzoru okužbe z EBV. Primarna EBV okužba spodbudi celični imunski odziv, tako da naraste število limfocitov T (do  $15 \times 10^9/L$ ). To so visoko aktivirane CD8+, MHC razred I citotoksične celice, specifične za litične (in manj za latentne) antogene (12). Limfocitoza v IM je posledica hiperekspanzije citotoksičnih CD8+ T celic z reaktivacijo latentnih in litičnih antigenov. V spominskih CD8+ T celicah se virusni antigeni vzdržujejo na visoki ravni (v krvnem obtoku do 5 %). EBV specifični CD4+ T-celični odziv pripomore k obvladovanju okužbe z EBV in igra pomembno vlogo pri preprečevanju neomejenega širjenja limfocitov, okuženih z EBV. Med akutno fazo bolezni, je do 40 % celotne periferne CV8+ T celičnega števila usmerjene proti enojnemu EBV epitopu. Oslabljen T-celični odziv z imunosupresivi ali okužbo HIV je odgovoren za razvoj poliklonskih limfoproliferacij, ki lahko privedejo do odkritega monoklonskega ne-Hodgkinovega limfoma. Te lezije so lahko kontrolirane z zdravljenje EBV specifičnimi T celicami. Rast in preživetje pri BL, NPC in Hodgkinovemu limfому pri imunokompetentnih osebah pomeni, da se lahko tumorske celice izognejo nadzoru EBV specifičnim T celicam, kar je mogoče doseči z omejevanjem izražanja latentnih EBV za te proteine, ki jih limfociti T ali MHC (glavni histokompatibilni kompleks) razred I ne prepoznajo (6).

## 1.8 BOLEZNI, POVEZANE Z VIRUSOM EPSTEIN-BARR

Primarna okužba z EBV v otroštvu je večinoma asimptomatska. Ko okužba poteka s simptomi, so pri dojenčkih in majhnih otrocih ti najpogosteje v obliki blagega vnetja žrela s tonsilitisom ali brez. Pri starejših otrocih in v adolescenci poteka okužba kot infekcijska mononukleoza. Virus se večinoma prenaša s slino, lahko pa tudi kryo, presadki ali s spolnim stikom. EBV okuži limfocite B in v večini povzroči doživljenjsko asimptomatsko okužbo (2).

Virus Epstein-Barr povezujejo z mnogimi boleznimi, pri nekaterih kot neposrednega povzročitelja, pri drugih pa kot dodatni dejavnik, ki vodi v bolezen.

Klinične oblike EBV okužb in malignomov, ki jih povezujemo z okužbo EBV (Preglednica VI) (2):

- Primarna EBV okužba
  - Asimptomatska serokonverzija
  - Infekcijska mononukloza
  - Primarna atipična EBV okužba
  - Genitalni ulkusi
  - Hemofagocitni sindrom
  - X-vezan limfoproliferativni sindrom
- Reaktivacija EBV okužbe
  - Limfoproliferativne nepravilnosti
  - Intersticijski pnevmonitis
  - Ustna lasasta levkoplakija
  - Uveitis
  - Ponavlajoči parotitis
- Klinične oblike malignomov, ki jih povezujemo z EBV okužbo
  - Burkittov limfom
  - Nediferencirani karcinom nosno-žrelnega prostora
  - T-celični limfom
  - Imunoblastni B-limfom
  - Limfoproliferacija po presaditvi organoc ali tkiv
  - Leiomiosarkom in leiomiom

**Preglednica VI:** Malignomi, značilni za okužbo z EBV (18)

		kratice	EB antigeni
limfoidni izvor	Infekcijska mononukleoza	IM	EBNA 1-6, LMP 1-2
	B-limfoproliferativna bolezen	BLPD	EBNA 1-6, LMP 1-2
	Burkittov limfom	BL	EBNA 1
	Hodgkinov limfom	HL	EBNA 1, LMP 1-2
	T/NK celični limfom	-	EBNA 1, LMP 1-2
epitelni izvor	Nazofaringealni karcinom	-	EBNA 1, LMP 1-2
	Ustna lasasta levkoplakija	-	-
	Karcinom želodca	-	EBNA 1, LMP 2A

### 1.8.1 Infekcijska mononukleoza

Infekcijska mononukleoza (IM) je akutna, limfoproliferativna bolezen, ki nastane po primarni okužbi z EBV (7).

Začne se z značilnim vnetjem v žrelu in oteklini na vratu, kar spremljajo nespecifična znamenja, kot so slabo počutje, vročina, potenje, mrazenje, glavoboli, pomanjkanje teka in rahle prebavne težave (12).

Redkeje se opazi izpuščaj, povečana vranica, še redkeje pa povečana jetra in zlatenica. Nekateri bolniki imajo periorbitalni edem, petehije na ustnem nebu, zelo redko hematološke zaplete in znake prizadetosti osrednje živčevja, srca ali pljuč.

Bezgavke so največkrat simetrično povečane v zadnjem predelu vrata, pogosto so povečane bezgavke tudi v drugih regijah vrata in drugje po telesu (2).

Za IM je značilna absolutna limfocitoza z netipičnimi mononuklearnimi celicami. V diferencialnem krvnem razmazu je več kot 50 % limfocitov, od tega je 20 % neznačilnih (7).

#### 1.8.1.1.1 Infekcijska mononukleoza pri otrocih in starejših

Ko se IM pojavi izven običajnega starostnega okvirja 15-25 let, pride lahko do netipičnih kliničnih znakov. Pri otrocih je bolezen blaga in večinoma ne zahteva zdravniške pozornosti. Običajno je prisotno vneto žrelo in povečane vratne bezgavke. Otroci včasih kažejo klasične klinične znake IM že pri dveh letih. Klinični znaki so pri starejših pogosto neznačilni (12).

#### 1.8.1.1.2 Infekcijska mononukleoza v nosečnosti

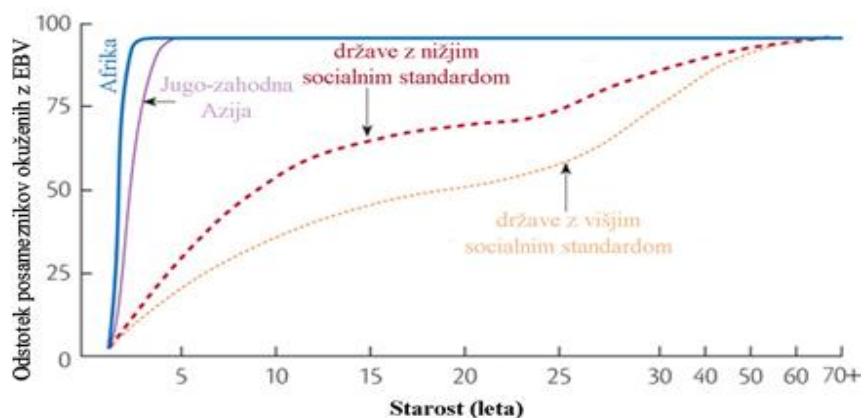
IM v času nosečnosti je redka, vendar če pride do okužbe, je to le redko lahko škodljivo za plod. Prekinitev nosečnosti ni indicirana (12).

#### 1.8.1.1.3 Infekcijska mononukleoza pri imunsko oslabljenih osebah

Ko se pojavi primarna okužba z EBV pri imunsko oslabljenih bolnikih, še posebej po presaditvi organov, je pogost simptom imunskega odziva nezmožnost tvorbe limfocitov, vendar lahko pride do netipične bolezni s simptomi v prebavilih in/ali znaki zavrnitve vsadka in odpoved. V takem primeru je laboratorijski izvid za heterofilna protitelesa negativen (12).

### 1.9 EPIDEMIOLOGIJA

Več kot 90 % asimptomatskih ljudi s protitelesi EBV virus izloča s slino. V manjših količinah se virus EBV izloča tudi v genitalnih izločkih. Virus v slini zagotavlja glavni vir za prenos okužbe. Otroci se okužijo s kužnimi kapljicami ali ko sesajo predmete, kontaminirane s slino. V državah v razvoju je 99,9 % odstotkov otrok okuženih že med drugim in četrtim letom starosti, vendar se v državah z visokim socialnim in higieniskim standardom otroci z EBV okužijo pozneje. Tako je odstotek z EBV prekuženih najstnikov in mladih odraslih v zahodnih državah odvisen od socialno-ekonomskega okolja, v katerem živijo (Slika 11) (19).



Slika 11: Primerjava starosti posameznikov v različnih populacijah, ki se okužijo z EBV (19)

#### 1.9.1 Razširjenost v Sloveniji

V raziskavi prekužnosti z EBV pri bolnikih v Sloveniji so bili v zaporedju treh let (1985, 1986, 1987) pregledani serumi 2.289 bolnikov iz vseh starostnih skupin. Pri 1.226 bolnikih je bila določena primarna okužba z EBV. Pri 53,2 % bolnikov je primarno okužbo spremjal sindrom IM, pri drugi polovici pa je bila klinična slika neznačilna. Velika je bila tudi prekuženost malih otrok (10).

## 2 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA

Okužbo z virusom EBV lahko laboratorijsko potrdimo z dokazom heterofilnih in/ali specifičnih protiteles ali z dokazom virusne DNA. Za dokazovanje primarnih okužb z EBV so primernejše serološke metode za dokaz heterofilnih (nespecifičnih) in specifičnih protiteles. Sekundarne okužbe in reaktivacije okužb z EBV, predvsem pri imunsko oslabljenih bolnikih, pa najbolj zanesljivo laboratorijsko dokažemo s prisotnostjo virusne DNA, najpogosteje v vzorcih plazme (20). Pregled diagnostičnih tehnik je prikazan v Preglednicah VII in VIII.

### 2.1 Serološka diagnostika okužb z EBV

#### 2.1.1 Dokazovanje heterofilnih protiteles

Laboratorijski dokaz heterofilnih protiteles se kot potrditev okužbe z EBV uporablja pri otrocih in odraslih. Pri izvajaju tega testa človeški serum najprej absorbiramo s homogeniziranim tkivom ledvic budre. Absorbiran serum v naslednjem koraku uporabimo za aglutinacijo ovčjih, konjskih ali govejih eritrocitov. Heterofilna protitelesa se vežejo z živalskimi eritrociti, ne pa s specifičnimi antigeni virusa EBV. Titer heterofilnih protiteles, večji od 40, pomeni potrditev diagnoze okužbe z EBV pri bolnikih z značilnimi kliničnimi znaki IM in prisotnimi atipičnimi limfociti. Test za heterofilna protitelesa je pozitiven pri 40 % bolnikov z IM že v prvem tednu bolezni in pri 80 do 90 % bolnikov v tretjem tednu, zato je včasih potrebno večkratno testiranje pacientov. Heterofilna protitelesa ostanejo dokazljiva tri mesece po bolezni, lahko pa vztrajajo tudi eno leto po preboleli okužbi. Heterofilnih protiteles običajno, iz sicer še neznanih razlogov, ne moremo dokazati pri otrocih, mlajših od 5 let, pri starejših in pri bolniki z atipično prezentacijo okužbe. Komercialno dosegljivi test monospot za dokaz heterofilnih protiteles je nekoliko bolj občutljiv in specifičen kot klasični test aglutinacije eritrocitov. Monospot test ima v primerjavi s specifičnimi serološkimi testi približno 75% občutljivost in 90% specifičnost. Lažno pozitivni testi na heterofilna protitelesa so pogostejši pri bolnikih z boleznimi veziva, limfomi, virusnim hepatitism in malarijo (21).

#### 2.1.2 Dokazovanje specifičnih protiteles

Dokaz specifičnih protiteles EBV je najbolj uporaben pri bolnikih, ki jim ne moremo dokazati prisotnosti heterofilnih protiteles, in tistih z netipično klinično sliko okužbe.

Specifična protitelesa razredov IgG in IgM, usmerjena proti antigenu kapside (VCA), lahko dokažemo pri več kot 90 % bolnikov že ob začetku bolezni. Za dokaz akutne okužbe je najprimernejše dokazovanje protiteles razreda IgM, ker so v veliki količini prisotna le dva do

tri mesece po akutni okužbi, nasprotno pa ostanejo specifična protitelesa IgG proti VCA v serumu vse življenje in so primernejša za dokazovanje pretekle okužbe.

Akutno okužbo lahko dokažemo tudi s pojavom (serokonverzijo) protiteles proti antigenom EBNA. Protitelesa IgG proti EBNA lahko dokažemo razmeroma pozno med potekom okužbe, in sicer šele tri do šest tednov po začetku simptomov. Po šestih tednih so specifična protitelesa IgG proti antigenom EBNA prisotna pri večini okuženih in ostanejo v krvi doživljenjsko. Imunsko oslabljeni bolniki in tisti s kronično aktivno okužbo včasih ne razvijejo protiteles IgG proti antigenom EBNA.

V serološki laboratorijski diagnostiki okužb z virusom EBV se lahko za natančnejše ali dodatno opredeljevanje stopnje okužbe uporablja tudi določanje protiteles IgG, usmerjenih proti antigenom EA virusa EBV. Glede na vzorec razporeditve jih lahko ločimo na difuzni tip EA-D (prisotna v citoplazmi in jedru) in omejeni tip EA-R (omejen le na citoplazmo). Ta protitelesa lahko pri bolnikih z IM dokažemo tri do štiri tedne po začetku simptomov, njihovo prisotnost pa lahko dokažemo tri do šest mesecev po okužbi. Protitelesa IgG EA-D so pogosta pri bolnikih s težko potekajočo okužbo (21).

Specifična protitelesa proti antigenom EBV razredov IgG in IgM lahko dokazujemo z različnimi laboratorijskimi metodami, opisanimi v Preglednicah VII in VIII.

**Preglednica VII:** Diagnostične metode za dokazovanje okužbe z EBV (22)

	Metode	Analit, antigen ali substrat	Opis
<b>Serološke metode</b>			
	Metoda posredne imunofluorescence (IFA)	celične linije, kot so P3HR-1 in Raji	Klasična metoda, ki je zlati standard. Visoka specifičnost. Določiti faze okužbe z EBV z enim samim vzorcem seruma.
	Reakcija vezave komplementa	lizat transformiranih EBV celičnih linij	Manj specifična in občutljiva. Ne uporablja se v rutinski analizi. Določanje faze okužbe ni možno z enim samim vzorcem.
	EIA, ELISA ali kemoluminiscenca s kroglicami, obdanimi s plaščem	lizat transformiranih EBV celičnih linij; EBV lizat; kombinacija lizata in rekombinantnih beljakovin; rekombinantne beljakovine; sintetični peptidi	Hitra in visoko občutljiva metoda, ki ponavadi avtomatizirana. Sintetični Peptidni antigeni so manj občutljivi in manj specifični. Analiza je možna z enim samim vzorcem seruma.
	Blot tehnike ( <i>Western blot</i> analiza ali linijska blot analiza)	lizat transformiranih EBV celičnih linij; EBV lizat; kombinacija lizata in rekombinantnih beljakovin; rekombinantne beljakovine	Visoko specifičen. Uporablja se večinoma kot potrditvena metoda. Analiza okužbe možna samo z enim vzorcem seruma.
	določanje avidnosti IgG, IFA in/ali ELISA ali <i>Western blot</i> analiza	Titracija protiteles v odsotnosti ali prisotnosti povečane koncentracije sečnine ali drugih kaotropnih reagentov	Posebna metoda, ki se uporablja za potrditev nedoločljivih rezultatov (protitelesa v akutnem obdobju okužbe z EBV so nizke avidnosti)
	Aglutinacija heterofilnih protiteles	Paul-Bunnell protitelesa; goveji eritrociti	Manj občutljiva in specifična. V 10 do 50 % otroci, stari manj kot 4 leta, ne tvorijo heterofilnih protiteles.

**Preglednica VIII:** Diagnostične metode za dokazovanje okužbe z EBV (22)

Metode	Analit, antigen ali substrat	Opis
Izolacija virusa	Limfoblastoidne celične linije iz pacientovih limfocitov	Analize se izvajajo v posebnih laboratorijsih. Test je uporaben dalj časa (od 4 do 8 tednov)
Analiza nukleinskih kislin s PCR	Limfociti, plazma, serum, likvor in tkiva	Metoda, ki jo izberemo, če imamo sum na okužbo z EBV in meningoencefalitis (iz likvorja). Uporabno za dokazovanje reaktivacije in koncentracije virusa
	in situ hibridizacija, in situ PCR	Uporablja se za analizo tumorjev, ki so povezani z okužbo z EBV.
	virusni antigeni, imunohistokemija in imunocitologija	Uporablja se za analizo tumorjev, ki so povezani z okužbo z EBV.

### **3 NAMEN DELA**

Namen diplomske naloge je bil primerjati dve metodi za dokazovanje specifičnih protiteles proti virusu EBV. V ta namen smo pregledali serume pacientov, ki so bili poslani v laboratorij za diagnostiko virusnih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo za dokazovanje specifičnih protiteles proti antigenom virusa Epstein-Barr. Izbrali smo aparaturi Liaison, proizvajalca DiaSorin, in aparaturo VIDAS®, proizvajalca, Biomerieux, ker imata obe kratek analizni čas in sta enostavni za uporabo.

Naš cilj je bil določiti ujemanje, specifičnost in občutljivost teh dveh analiznih postopkov.

## 4 MATERIALI IN METODE

### 4.1 Vzorci

V raziskavo smo vključili 109 vzorcev (serumov) bolnikov s sumom na okužbo z EBV, ki smo jih izbrali iz rutinske dejavnosti Laboratorija za diagnostiko virusnih okužb Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Vzorci so bili do analize s sistemom VIDAS shranjeni v zaprtih plastičnih epruvetah v zamrzovalniku pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2 METODE

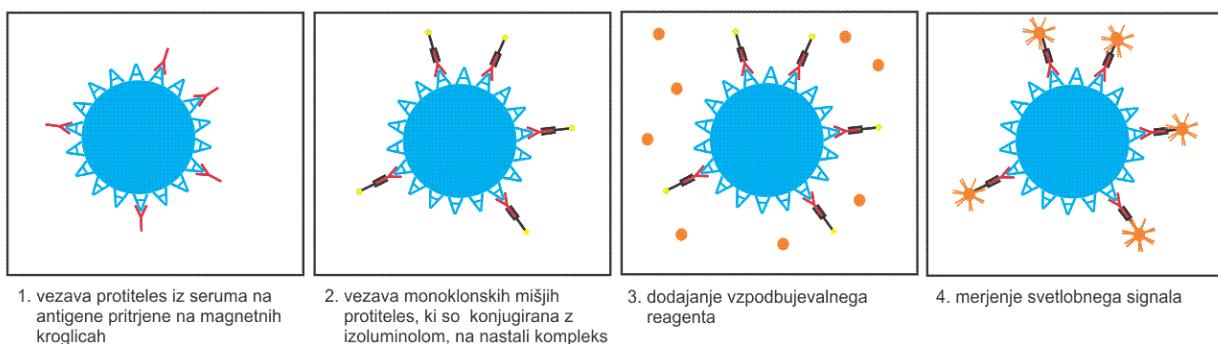
Za dokaz specifičnih protitieles proti virusu Epstein-Barr smo uporabili dve metodi. Uporabili smo encimsko imunsko fluorescenčno metodo ELFA (sistem Vidas, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francija) in kemiluminiscenčno imunsko metodo CLIA (sistem Liaison, DiaSorin, Saluggia, Italija).

Vsi serumi, uporabljeni v tej diplomski nalogi, so bili v rutinski diagnostiki predhodno že testirani s kemiluminiscenčno imunsko metodo CLIA (sistem Liaison), zato v diplomskem delu rezultatov te metode nismo ponavljali.

Serološke preiskave smo izvajali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, in sicer v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij.

#### 4.2.1 PRINCIP METODE CLIA

Za namen diplomske naloge smo uporabili rezultate, predhodno pridobljene z metodo Liaison. Kemiluminiscenčna imunska metoda (CLIA; ang. *chemiluminescence immunoassay*) je metoda, ki je v osnovi zelo podobna encimsko imunski metodi (ELISA). Metoda je pogosto uporabljena v rutinski laboratorijski diagnostiki za kvantitativno določanje specifičnih protiteles pri okužbi z EBV. Protitelesa, ki jih določamo, se vežejo na antigen, njihovo vezavo pa dokažemo z mišjimi monoklonskimi protitelesi, na katera je konjugiran izoluminolni derivat (Slika 12). Če pride do vezave konjugata na prvi kompleks, se po dodajanju spodbujevalnega reagenta (vsebuje vodikov peroksid in encim peroksidazo) sprosti svetlobni signal, ki ga aparatura izmeri kot relativno luminiscenčno enoto (RLU) in rezultat v teh enotah kaže na koncentracijo protiteles v vzorcu (23).



Slika 12: Princip metode CLIA.

#### 4.2.1.1 Vrednotenje rezultatov za Liaison

Analizator Liaison izmeri svetlobni signal, ki ga odda izoluminolni-protitelesni konjugat v relativnih luminiscenčnih enotah RLU (ang.: *relative luminescence units*) in je sorazmeren s koncentracijo protiteles v vzorcih, kontrolah in standardih. Rezultate koncentracij poda v enotah/ml (U/ml).

Mejne vrednosti so za razliko od miniVIDASA za vse štiri označevalce podane ločeno (Preglednica IX). Podane so meje za vse štiri vrste protiteles, znotraj katerih lahko vrednotimo meritve:

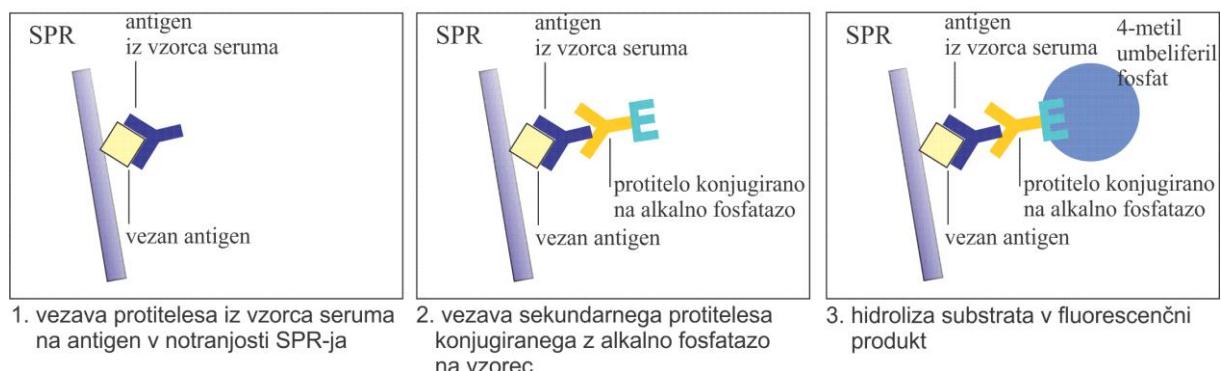
- anti-VCA IgM 0-160 U/mL
- anti-VCA IgG 0-750 U/mL
- anti-EBNA IgG 0-600 U/mL
- anti-EA(D) IgG 0-150 U/mL

**Preglednica IX:** Interpretacija mejnih vrednosti rezultatov kemiluminiscenčnega testa Liaison (23)

Vrsta protitelesa	negativna vrednost (U/mL)	mejna vrednost (U/mL)	pozitivna vrednost (U/mL)
<b>anti-VCA IgM</b>	< 20	20-40	$\geq 40$
<b>anti-VCA IgG</b>	< 20	20	$\geq 20$
<b>anti-EBNA IgG</b>	< 5	5-20	$\geq 20$
<b>anti-EA(D) IgG</b>	< 40	40	$\geq 40$

#### 4.2.2 METODA ELFA Z ANALIZATORJEM miniVIDAS

Analizna metoda je kombinirana v dveh korakih encimske imunske sendvič metode s končnim fluorescenčnim detektorjem (ELFA) (Slika 13).



**Slika 13:** Shematski prikaz poteka metode »sendvič« ELFA v SPR-ju

Občutljivost testa izhaja iz dejstva, da ena sama molekula encima lahko reagira z velikim številom molekul substrata, kar je možno zaznati že v nizkih koncentracijah.

SPR služi kot trdna faza in pipetni nastavek za spiranje. Reagenti za analizno metodo so pripravljeni v zapečatenih reagenčnih posodicah.

V prvem koraku reakcije se protitelesa iz vzorca vežejo na antigen v notranosti SPR. Nevezane komponente se sperejo v nadaljevanju med postopkom spiranja. V naslednjem koraku se mišja monoklonska protitelesa (IgG v obliki Fab), konjugirana z alkalno fosfatazo, vežejo na protitelesa iz vzorca, ki so pritrjena na antigen, vezan na SPR. V zadnjem koraku dodamo substrat (4-metil-umbeliferil fosfat). Konjugirani encim katalizira hidrolizo substrata v fluorescenčni produkt. Fluorescenco produkta merimo pri 450 nm. Intenzivnost fluorescence je sorazmerna s koncentracijo protiteles v vzorcu. Na koncu analize so rezultati avtomatsko preračunani glede na standard (24).

##### 4.2.2.1 Laboratorijska oprema in reagenti

Za izvedbo metode ELFA smo potrebovali analizator miniVIDAS® (Bio Merieux) (slika 14) in komercialno pripravljene komplete za določitev posamezne vrste protiteles (Preglednice X, XI in XII).



**Slika 14:** Analizator miniVIDAS

#### 4.2.2.2 Vsebnost kompletov

**Preglednica X:** Vsebnost diagnostičnih kompletov reagentov s 30 testnimi reagenčnimi posodicami za EBV VCA/EA IgG (25)

30 EBV VCA/EA IgG stripov	STR	za takojšnjo uporabo
30 EBV VCA/EA IgG SPR-jev 1x30	SPR	za takojšnjo uporabo, notranjost SPR obdana z VCA P18 in EA P54 protitelesi
EBV VCA/EA IgG pozitivna kontrola 1x0,6 mL (raztopine)	C 1	človeški serum z anti-VCA IgG v fosfatnem pufru pH 7,4 + 50 g/L BSA + konzervansi
EBV negativna kontrola 1x0,6 mL (raztopine)	C 2	fosfatni pufer pH 7,4 + BSA 50g/L + konzervansi
EBV VCA/EA IgG standard 1x1,6 mL (raztopine)	S 1	človeški serum z anti-VCA IgG v fosfatnem pufru pH 7,4 + 50 g/L BSA + konzervansi
1 MLE kartica (kartica z umeritveno krivuljo)		karton s podatki za kalibracijo z uporabo umeritvene krivulje

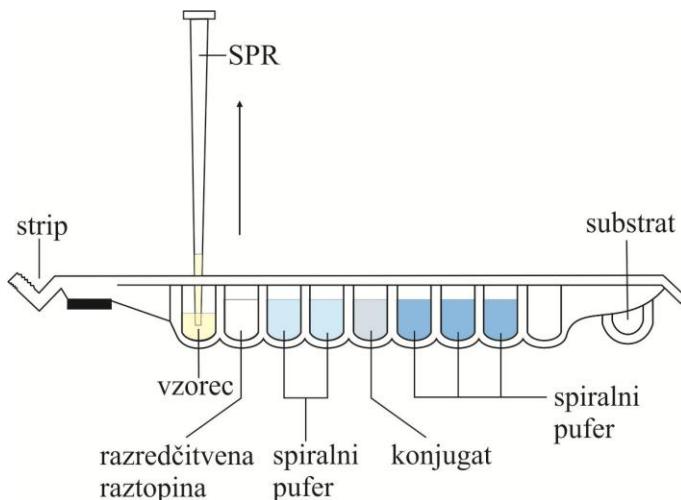
**Preglednica XI:** Vsebnost diagnostičnih kompletov reagentov s 30 testnimi reagenčnimi posodicami za EBV VCA IgM (26)

30 EBV VCA IgM stripov	STR	za takojšnjo uporabo
30 EBV VCA IgM SPR-jev 1x30	SPR	za takojšnjo uporabo, notranjost SPR obdana z monoklonalnimi anti-humanimi IgM protitelesi
EBV VCA IgM pozitivna kontrola 1x0,6 mL (raztopine)	C 1	človeški serum z anti-VCA IgM v fosfatnem pufru pH 7,4 + 50 g/L BSA + konzervansi
EBV negativna kontrola 1x0,6 mL (raztopine)	C 2	fosfatni pufer pH 7,4 + BSA 50g/L + konzervansi
EBV VCA IgM standard 1x1,6 mL (raztopine)	S 1	človeški serum z anti-VCA IgM v fosfatnem pufru pH 7,4 + 50 g/L BSA + konzervansi
1 MLE kartica (kartica z umeritveno krivuljo)		karton s podatki za kalibracijo z uporabo umeritvene krivulje

**Preglednica XII:** Vsebnost diagnostičnih kompletov reagentov s 30 testnimi reagenčnimi posodicami za EBV EBNA IgG (24)

30 EBV EBNA IgG stripov	STR	za takojšnjo uporabo
30 EBV EBNA IgG SPR-jev 1x30	SPR	za takojšnjo uporabo, notranjost SPR obdana z EBNA-1 P72 protitelesi
EBV EBNA IgG pozitivna kontrola 1x0,6 mL (raztopine)	C 1	človeški serum z anti-EBNA IgG v fosfatnem pufru pH 7,4 + 50 g/L BSA + konzervansi
EBV negativna kontrola 1x0,6 mL (raztopine)	C 2	fosfatni pufer pH 7,4 + BSA 50g/L + konzervansi
EBV EBNA IgG standard 1x1,6 mL (raztopine)	S 1	človeški serum z anti-EBNA IgG v fosfatnem pufru pH 7,4 + 50 g/L BSA + konzervansi
1 MLE kartica (kartica z umeritveno krivuljo)		karton s podatki za kalibracijo z uporabo umeritvene krivulje

#### 4.2.2.3 Prostorčki v reagenčnih posodicah



**Slika 15:** Shematski prikaz reagenčnih posodic za aparat miniVIDAS in njegove komponente

Reagenčne posodice vsebujejo deset prostorčkov z oznakami in kovinsko folijo (Slika 15). Oznake na reagenčnih posodicah vsebujejo bar kodo, ki označuje analizno kodo diagnostičnega kompleta reagentov, številko in datum poteka. Folija na prvem prostorčku je predrta za hitrejše odmerjanje vzorca. Zadnji prostor v stripu je kiveta, v kateri poteka flouremetrija (spektrometrija). Prostorčki v centru stripa vsebujejo različne variacije reagentov, potrebnih za analizo (Preglednice XIII, XIV in XV) (24).

**Preglednica XIII:** Opis vsebine reagenčnih posodic za VCAG (25)

prostorčki	reagenti
1	prostor za vzorec
2	razredčitvena raztopina: fosfatni pufer + polisorbat 20 0,05% pH 7,2 + 5 g/L BSA + konzervansi (600µL)
3-4-5-7-8	spiralni pufer: fosfatni pufer + polisorbat 20 0,25% pH 7,8 + 5g/l BSA + konzervansi (600µL)
6	konjugat: alkalni, fosfatno označena mišja anti-humana IgG protitelesa in fosfatni pufer pH 6,1 + proteinski stabilizatorji + konzervansi (400µL)
9	raztopina za razredčitev vzorca: fosfatni pufer + polisorbat 20 0,25% pH 7,2 + 5g/l BSA + konzervansi (400µL)
10	kiveta za odčitavanje z substratom: 4-metil-umbeliferil fosfat (0,6 mmol/l) + dietanolamin (DEA*) (0,62 mil/l or 6,6%, pH 9,2) + 1g/l natrijeva kislina (300µl)

**Preglednica XIV:** Opis vsebine reagenčnih posodic za VCAM (26)

prostorčki	reagenti
1	prostor za vzorec
2	razredčitvena raztopina: fosfatni pufer + polisorbat 20 0,05% pH 7,2 + 5 g/L BSA + konzervansi (600µL)
3-4-5-7-8	spiralni pufer: fosfat pufer + polisorbat 20 0,25% pH 7,8 + 5g/l BSA + konzervansi (600µL)
6	konjugat: alkalni, fosfatno označeni VCA P18 protitelesa in fosfatni pufer pH 6,1 + proteinski stabilizatorji + konzervansi (400µL)
9	Prazen prostorček
10	kiveta za odčitavanje z substratom: 4-metil-umbeliferil fosfat (0,6 mmol/l) + dietanolamin (DEA*) (0,62 mil/l or 6,6%, pH 9,2) + 1g/l natrijeva kislina (300µl)

**Preglednica XV:** Opis vsebine reagenčnih posodic za EBNA (24)

prostorčki	reagenti
1	prostor za vzorec
2	razredčitvena raztopina: fosfatni pufer + polisorbat 20 0,05% pH 7,2 + 5 g/L BSA + konzervansi (600µL)
3-4-5-7-8	spiralni pufer: fosfat pufer + polisorbat 20 0,25% pH 7,8 + 5g/l BSA + konzervansi (600µL)
6	konjugat: alkalni, fosfatno označeni mišji anti-human IgG protitelesa in fosfatni pufer pH 6,1 + proteinski stabilizatorji + konzervansi (400µL)
9	raztopina za razredčitev vzorca: fosfatni pufer + polisorbat 20 0,25% pH 7,2 + 5g/l BSA + konzervansi (400µL)
10	kiveta za odčitavanje z substratom: 4-metil-umbeliferil fosfat (0,6 mmol/l) + dietanolamin (DEA*) (0,62 mil/l or 6,6%, pH 9,2) + 1g/l natrijeva kislina (300µl)

#### 4.2.3 Ostale aparature in pripomočki

- pipeta Biohit 20 - 200 µl
- nastavki za pipetiranje 100 µl
- plastične rokavice (brez praška)
- vorteks mešalnik (centrifuga top-mix 11118 Fisher Bioblock Scientific™)

## **4.3 Postopek laboratorijskega dela**

### **4.3.1 Priprava vzorcev**

Pred analizo smo vzorce, hranjene v zamrzovalniku na temperaturi -20 °C, odmrznili pri sobni temperaturi v 30 minutah (24).

### **4.3.2 VIDAS PTC protokol vnosa podatkov**

Pred uporabo analizatorja za analizo smo skenirali kartico MLE s čitalnikom bar kod miniVIDAS. S prenosom protokola VIDAS PTC v analizator miniVIDAS je program naredil nadgradnjo. Te podatke smo vnesli samo pred prvo analizo ali po zahtevi analizatorja VIDAS (24).

### **4.3.3 Vnos umeritvene krivulje**

Pred prvo analizo smo morali vnesti protokol VIDAS in šele nato prebrati kartico MLE z čitalnikom bar kod.

Za vsak nov kit reagentov smo morali vsakič vnesti specifikacije in kartico MLE (umeritvene krivulje), ki je bila vključena v vsak komplet. Ta postopek smo morali opraviti vsakič pred uporabo novih reagentov (24).

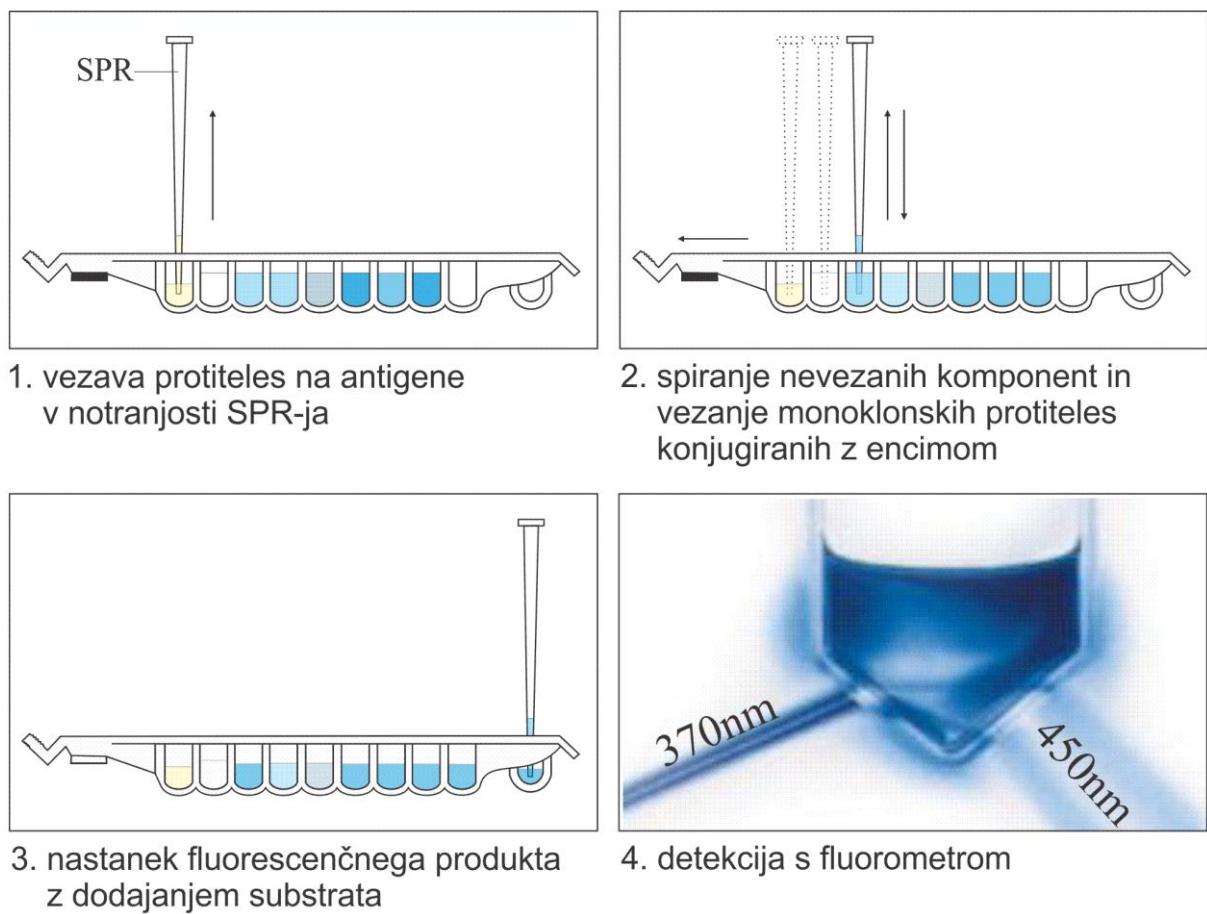
### **4.3.4 Kalibracija**

Po opravljeni kalibraciji z uporabo standardov, ki so bili vključeni v komplet in smo jih uporabili vsakič pred uporabo novih reagentov, ter po vnosu standardne umeritvene krivulje s kartico MLE (24).

### **4.3.5 Postopek analize**

- Vzeli samo potrebne reagente iz hladilnika in jih pustili na sobni temperaturi 30 minut.
- Uporabili smo VCAG/VCAM/EBNA reagenčne posodice in »VCAG/VCAM/EBNA« SPR-je za vsak vzorec, kontrolo ali standard, ki smo ga testirali.
- Vtipkali ali določili smo VCAG/VCAM/EBNA v inštrument in vnesli testno kodo. Standard mora biti identificiran z S1 in testiran v trojniku. Testirali smo tudi pozitivno C1 in negativno C2 kontrolo.
- Pred pipetiranjem smo standard, kontroli in vzorce premešali z vorteks mešalnikom.
- Standard, kontroli in vzorce smo pipetirali v vzorčne odprtine z nastavkom 100 µL.

- Vstavili smo nastavke SPR in reagenčne posodice v analizator miniVIDAS. Vedno smo preverili, da so se barvne oznake nalepk SPR-jev in reagenčnih posodic ujemale.
- Za pričetek analize smo določili postopke z vnosom podatkov, kot je to navedeno v navodilih.
- Vsi koraki analize so bili izvedeni avtomatično. Rezultate smo dobili v času 40 minut (Slika 16).
- Po opravljeni analizi smo iz analizatorja odstranili SPR-je in reagenčne posodice. Te smo zavrgli v koš z biološkimi odpadki (24).



**Slika 16:** Shematski prikaz avtomatiziranega dela, ki poteka v analizatorju miniVIDAS

#### 4.3.6 Vrednotenje rezultatov za miniVIDAS

Analizni rezultati, pridobljeni v obliki RFV (ang.: *realitive fluorescence value*) na sistemu VIDAS, so izračunani na podlagi testne vrednosti TV (ang.: *test value*):

$$Testna\ vrednost\ (TV) = \frac{RFV\ vzorca}{strandard\ RFV}$$

Vrednost RFV izračunamo z odštetjem vrednosti ozadja od izmerjene končne vrednosti za analit (24).

Mejne vrednosti za analizne rezultate so interpretirane, kot je vpisano v Preglednici XVI:

**Preglednica XVI:** Interpretacija mejnih vrednosti rezultatov encimsko fluorescenčnega imunskega testa miniVIDAS (Bio Merieux) (24).

interpretacija	Testne vrednosti (TV)
negativna vrednost	$\leq 0,11$
mejna vrednost	$0,12 \leq TV \leq 0,18$
pozitivna vrednost	$\geq 0,19$

#### 4.3.7 Vrednotenje rezultatov glede na status okužbe

Z rezultati specifičnih protiteles smo pri obeh metodah (pozitivno, negativno ali mejno vrednost) opredelili z različnimi stopnjami ali fazami okužbe z EBV.

Za vsako obdobje okužbe z virusom EBV so značilna protitelesa, usmerjena proti določenim antigenom. Tako lahko ločimo zgodnjo akutno okužbo od akutne in pretekle akutne okužbe.

Status okužb smo na podlagi Preglednice XVII opredelili in označili:

**Preglednica XVII:** Serološki status okužbe z EBV na podlagi specifičnih protiteles (27)

Legenda: + pozitiven rezultat, - negativen rezultat

status okužbe	oznaka	vrsta protiteles			
		EA IgG	VCA IgM	VCA IgG	EBNA IgG
odsotnost specifičnih protiteles	NEG	-	-	-	-
zgodnja akutna okužba	ZG A	- (+)	+	-	-
akutna okužba	A	- (+)	+	- (+)	-
po okužbi	PO INF	-	-	+	+
izolirani EBNA IgG	IZOL EBNA	-	-	-	+
izolirani VCA/EA IgG	IZOL VCA/EA	+	-	+	-
nedoločljiv profil	NP	+	+	+	+

#### 4.3.8 Izračun diagnostične občutljivosti, specifičnosti in napovedne vrednosti testov

**Občutljivost testa** izrazimo z odstotkom oseb z določeno okužbo, pri katerih je rezultat testa pozitiven (pravilno pozitivni, PP). Negativen rezultat testa pri okuženih osebah pomeni lažno negativen rezultat (lažno negativni, LN). Občutljivost diagnostičnega testa predstavlja sposobnost dokazovanja najmanjše količine določenega antiga na ali protiteles (28).

$$občutljivost(\%) = \frac{PP}{PP + LN}$$

**Specifičnost testa** izrazimo z odstotkom zdravih, neokuženih oseb, pri katerih je rezultat testa negativen (pravilno negativni, PN). Pozitiven rezultat testa pri okuženih osebah pomeni lažno pozitiven rezultat (lažno negativni, LP). Specifičnost diagnostičnega testa predstavlja sposobnost ločevanja določenega antiga na ali protiteles od drugih antigenov ali protiteles (28).

$$specifičnost(\%) = \frac{PN}{PN + LP}$$

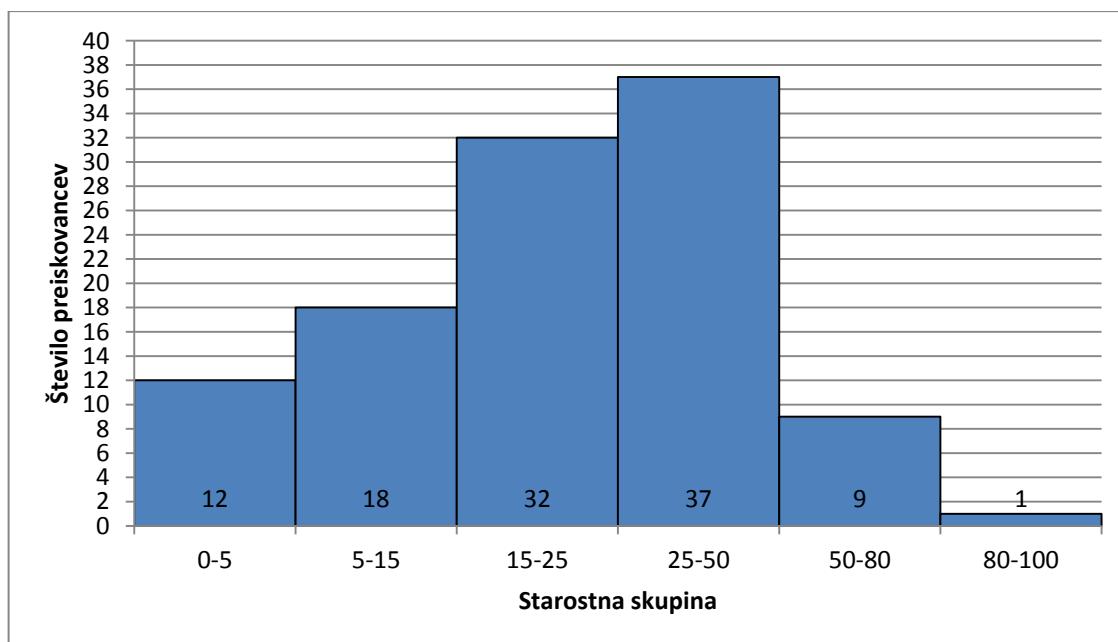
## 5 REZULTATI

V diplomski nalogi smo primerjali rezultate dokazovanja specifičnih protiteles za 109 serumskih vzorcev preiskovancev s sumom na okužbo z virusom Epstein-Barr. Rezultate, ki smo jih v okviru naloge pridobili na analizatorju miniVIDAS, smo primerjali z rezultati, ki so jih v okviru rutinske diagnostike določili na analizatorju Liaison.

V raziskavo smo vključili 65 serumskih vzorcev žensk (59,6 %) in 44 vzorcev moških (40,4 %).

32 (29,4 %) preiskovancev je pripadalo starostni skupini od 15 do 25 leta, 37 (34 %) pa starostni skupini od 25 do 50 leta starosti. 12 (11 %) preiskovancev je bilo mlajših od 5 let, 18 (16,5 %) preiskovancev iz starostne skupine od 5 do 15 let, ter 9 (8,3 %) starejših od 50 let. Samo en preiskovanec je presegel starost 80 let.

Največ preiskovancev je bilo starih od 25 do 50 let. Število preiskovancev po posameznih starostnih skupinah prikazuje Slika 17:



Slika 17: Število preiskovancev v posamezni starostni skupini

## 5.1 Primerjava rezultatov med testoma Liaison in miniVIDAS

(Preglednica XVIII in Preglednica XIX)

**Preglednica XVIII:** Primerjava števila in deleža pozitivnih, negativnih in mejnih vrednosti za testirane vzorce

Število (%) serumov				
	Pozitivna vrednost	Negativna vrednost	Mejna vrednost	Vsota vseh vzorcev
CLIA VCA IgM	22 (20,2)	82 (75,2)	5 (4,6)	109 (100)
ELFA VCA IgM	21 (19,3)	84 (77,0)	4 (3,7)	109 (100)
CLIA VCA IgG	95 (87,2)	14 (12,8)	0 (0,0)	109 (100)
CLIA EA IgG	15 (13,8)	94 (86,2)	0 (0,0)	109 (100)
VIDAS VCA/EA IgG	93 (85,3)	12 (11,0)	4 (3,7)	109 (100)
CLIA EBNA IgG	72 (66,1)	31 (28,4)	6 (5,5)	109 (100)
ELFA EBNA IgG	78 (71,6)	28 (25,7)	3 (2,8)	109 (100)

**Preglednica XIX:** Primerjava (ujemanje, občutljivost, specifičnost) rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles proti EBV s testoma Liaison in miniVIDAS

+ pozitiven rezultat, - negativen rezultat, +/- mejna vrednost

Liaison						
miniVIDAS	+	-	+-	ujemanje (%)	občutljivost (%)	specifičnost (%)
	VCA IgM			89,0	95,2	97,5
	+	20	2	0		
	-	1	77	4		
	+-	0	5	0		
	VCA/EA IgG			94,5	97,8	100
	+	91	0	4		
	-	2	12	0		
	+-	0	0	0		
	EBNA IgG			93,6	97,3	100
	+	72	0	0		
	-	2	28	1		
	+-	4	0	2		

S primerjavo rezultatov določanja specifičnih protiteles VCA IgG med testoma miniVIDAS in Liaison smo ugotovili skladne rezultate pri 97 preiskovanih vzorcih (89,0 %) in neskladne

pri 12 (11,0 %) vzorcih. V dveh vzorcih s testom miniVIDAS nismo dokazali protiteles VCA IgG, test Liaison pa jih je ovrednotil kot pozitivne.

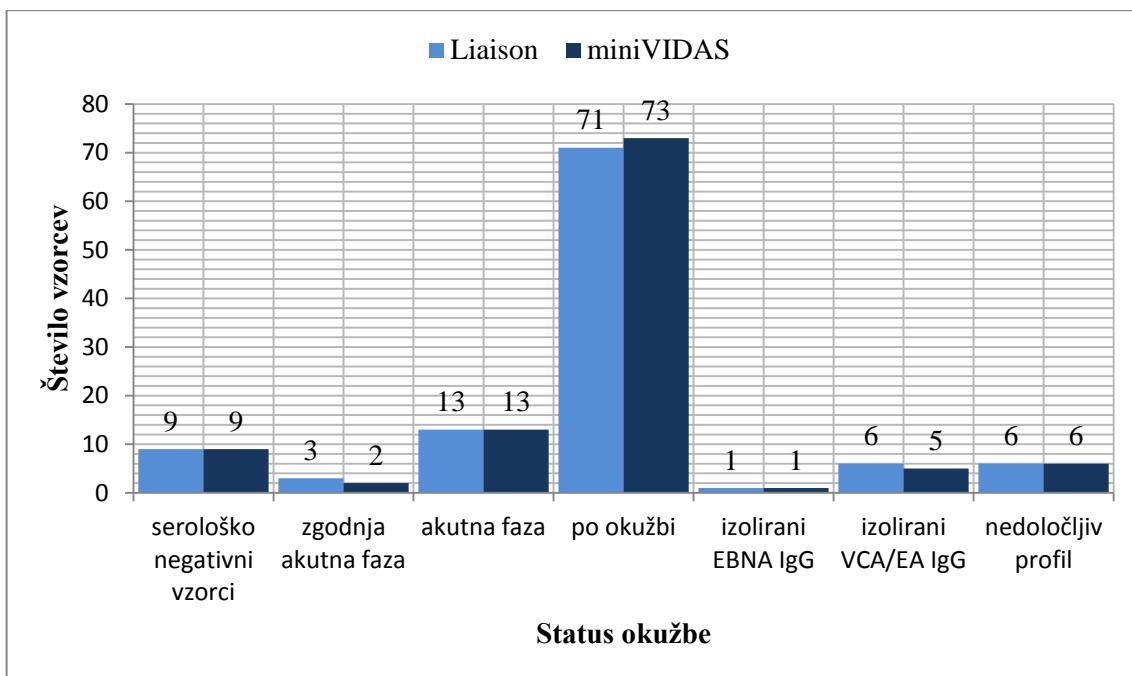
V enem primeru smo dobili obraten rezultat, ko je test Liaison opredelil vzorec kot negativen, test miniVIDAS pa ga je opredelil kot pozitivnega. Pri testu Liaison smo pri 5 vzorcih določili mejne vrednosti, test miniVIDAS pa jih je opredelil kot negativne. Tudi pri testu miniVIDAS smo določili 4 mejne rezultate, ki jih je test Liaison opredelil kot negativne. Občutljivost testa miniVIDAS za VCA IgM je bila 95,2 %, specifičnost pa 97,5 %.

Za specifična protitelesa VCA/EA IgG smo s testoma Liaison in miniVIDAS dokazali skladnost pri 91 pozitivnih vzorcih (83,5 %) in 12 negativnih (11,0 %). Ujemanje rezultatov pri obeh testih smo ugotovili pri 103 (94,5 %) vzorcih in neujemanje pri 6 (5,5 %) vzorcih. Pri dveh vzorcih smo s testom Liaison ugotovili negativni rezultat, ki jih je test miniVIDAS ovrednotil kot pozitivne. Za 4 vzorce, ovrednotene z mejno vrednostjo pri testu miniVIDAS, smo s testom Liaison dokazali protitelesa VCA IgG. Za test miniVIDAS VCA IgG smo izračunali občutljivost 97,8 % in specifičnost 100 %.

Za specifična protitelesa EBNA IgG smo ugotovili ujemanje rezultatov testiranja pri 100 (91,7 %) in neujemanje pri 9 (8,3%) vzorcih. Skladnost smo ugotovili pri 72 (66,1 %) pozitivnih, 28 (25,7 %) negativnih in dveh (1,8 %) mejnih rezultatih. Za dva negativna rezultata pri testu Liaison smo z testom miniVIDAS interpretirali vzorce kot pozitivne. Štiri pozitivne rezultate pri testu miniVIDAS smo s testom Liaison ovrednotili kot mejno pozitivne. En mejni rezultat, določen s testom miniVIDAS, smo pri testu Liaison ovrednotili kot negativen. Za EBNA IgG smo izračunali 97,3 % občutljivost in 100 % specifičnost.

## 5.2 Rezultati skladnosti metod na podlagi serološkega statusa okužbe

Na podlagi rezultatov dokazovanja specifičnih protiteles v imunskega odziva na okužbo EBV, smo glede na Preglednice XIV opredelili status oziroma stopnje okužbe in jih prikazali s stolpčnim diagramom na Sliki 18:



Slika 18: Skladnost med metodo ELFA (miniVIDAS) in CLIA (Liaison) glede na status okužbe

Pri devetih vzorcih z nobeno od uporabljenih metod nismo dokazali specifičnih protiteles proti virusu EBV, zato smo jih opredelili kot serološko negativne vzorce.

S statusom »zgodnjega akutnega obdobja« smo označili tri vzorce s testom Liaison in dva vzorca s testom miniVIDAS. Akutno okužbo smo opredelili pri 13 vzorcih s testom Liaison in s testom miniVIDAS. Status »po infekciji« smo opredelili pri 73 vzorcih s testom miniVIDAS in pri 71 s testom Liaison.

Nedoločljiv profil smo opredelili pri testu Liaison in miniVIDAS pri šestih vzorcih. Izključno protitelesa VCA IgG (Liaison) in VCA/EA IgG smo dokazali pri šestih vzorcih s testom Liaison, ter petih vzorcih s testom miniVIDAS. Z obema uporabljenima testoma smo pri enem vzorcu dokazali izključno EBNA IgG protitelesa.

Serološki status posameznikov smo definirali z interpretacijo posameznih označevalcev (Preglednica XIX) in ugotovili skladnosti metod (Preglednica XX)

**Preglednica XX:** Skladnost rezultatov serološkega statusa v primerjavi testa miniVIDAS s testom Liaison

		miniVIDAS							
		nedoločljiv profil	serološko negativni	zgodnja akutna faza	akutna faza	po okužbi	izolirani EBNA IgG	izolirani VCA/EA IgG	SKUPAJ
Liaison	nedoločljiv profil	5	0	0	0	1 (14)	0	0	6
	serološko negativni	0	8	0	0	0	1 (69)	0	9
	zgodnja akutna faza	0	1 (66)	2	0	0	0	0	3
	akutna faza	0	0	0	13	0	0	0	13
	po okužbi	1 (61)	0	0	0	70	0	0	71
	izolirani EBNA IgG	0	0	0	0	1 (25)	0	0	1
	izolirani VCA/EA IgG	0	0	0	0	1 (77)	0	5	6
	SKUPAJ	6	9	2	13	73	1	5	109

Od 109 preiskovanih vzorcev so bile 103 skladne interpretacije statusa okužbe (94,5 %) in šest (5,5 %) neskladnih. Med neskladnimi sta bila dva vzorca 66 in 69 (1,8 %) v Preglednici XX zelo odstopajoča (ang. *major discrepancy*), saj je bila razlika med serološko negativnimi in serološko pozitivnimi rezultati. Štirje vzorci 25, 77, 14 in 61 (3,7 %), ki so malenkostno odstopali (ang. *minor discrepancy*), so bili vsi serološko pozitivni in je razlika le v stadiju bolezni.

Največ preiskovancem smo določili status okužbe »po okužbi« 70 (64,2 %). Pri petih (4,6 %) vzorcih nismo mogli opredeliti statusa okužbe.

**Preglednica XXI:** Prikaz neskladnih rezultatov testov miniVIDAS in Liaison

	metoda	VCA IgM	VCA/EA IgG	EBNA IgG	status okužbe		metoda	VCA IgM	VCA IgG	EA IgG	EBNA IgG	status okužbe
14	ELFA	NEG	POZ	POZ	PO INF		CLIA	POZ	POZ	NEG	POZ	NP
25	ELFA	NEG	POZ	POZ	PO INF		CLIA	NEG	NEG	NEG	POZ	IZOL EBNA
61	ELFA	POZ	POZ	POZ	NP		CLIA	NEG	POZ	NEG	POZ	PO INF
66	ELFA	NEG	NEG	NEG	NEG		CLIA	POZ	NEG	NEG	NEG	ZG A
69	ELFA	NEG	NEG	POZ	IZOL EBNA		CLIA	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
77	ELFA	NEG	POZ	POZ	PO INF		CLIA	NEG	POZ	NEG	NEG	IZOL VCA

Za vzorca 14 in 25 smo s testom miniVIDAS določili status »po infekciji«. Z metodo Liaison smo vzorec 14 interpretirali kot neopredeljen in vzorec 25 kot »izolirana EBNA IgG protitelesa« (Preglednica XXI).

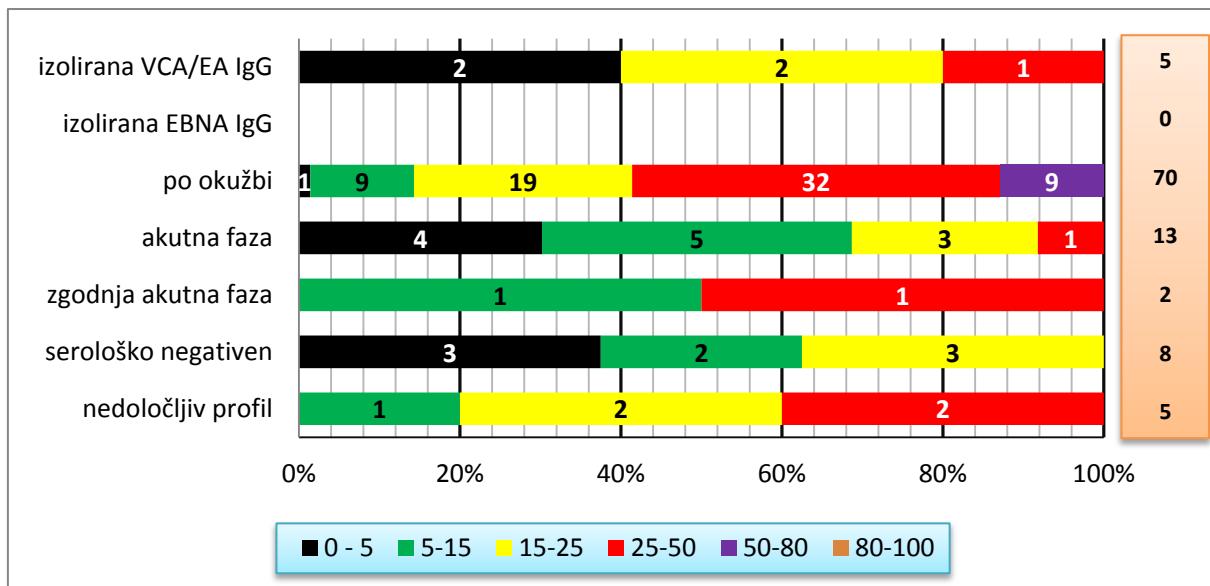
Vzorec 61 smo s testom miniVIDAS interpretirali kot »neopredeljen profil«, pri testu Liaison pa s statusom »po okužbi« (Preglednica XXI).

Vzorec 66 smo s testom miniVIDAS določili kot negativen, s testom Liaison pa smo vzorec 66 interpretirali kot »zgodnjo akutno okužbo« (Preglednica XXI).

S testom miniVIDAS smo pri vzorcu 69 določili »izolirana EBNA IgG protitelesa«, s testom Liaison pa smo ga opredelili kot negativnega (Preglednica XXI).

Pri vzorcu 77 smo s testom miniVIDAS določili status »po okužbi«, s testom Liaison pa smo dokazali »izolirana VCA IgG protitelesa« (Preglednica XXI).

Slika 19 spodaj prikazuje skladne rezultate seroloških testov miniVIDAS in Liaison. V tem grafu smo opredelili skladne rezultate glede na starostne skupine in serološki status (Preglednica XXI).



**Slika 19:** Primerjava seroloških statusov, ugotovljenih z metodama miniVIDAS in Liaison glede na starostno skupino pacientov

Ugotovili smo, da je največji odstotek prekuženosti z EBV pri skupini 25-50 let za 32 (45,7%) preiskovancev, ki ji sledi skupina 15-25 let 19 (27,1 %) preiskovancev.

Zgodnjo akutno okužbo smo ugotovili pri enem preiskovancu iz starostne skupine 5-15 let in enem iz skupine 25-50 let.

Največ bolnikov (5) je bilo v akutni fazi odkritih v starostni skupini od 5-15 let (38,5 %).

## 6 RAZPRAVA

Laboratorijska diagnostika primarnih okužb z virusom EBV se večinoma izvaja s serološkimi testi. Najbolj pogosto uporabljeni metoda v laboratorijih je dokazovanje heterofilnih protiteles, ki jih pri večini odraslih bolnikov lahko dokažemo v tretjem tednu po pojavi kliničnih znakov okužbe z virusom EBV. Metoda dokazovanja heterofilnih protiteles ni primerna za diagnostiko infekcijske mononukleoze pri otrocih, mlajših od pet let, kjer heterofilnih protiteles ni mogoče dokazati pri večini bolnikov. Enako velja za starejše osebe in bolnike z netipično klinično sliko okužbe z EBV. V navedenih primerih je za diagnostiko akutne okužbe najbolj primerno dokazovanje specifičnih protiteles z encimskoimunsko ali kemoluminiscenčno metodo.

V diplomski nalogi smo želeli primerjati dva serološka testa za analizo 109 zaporednih vzorcev pacientov s sumom na okužbo z EBV. Želeli smo ugotoviti primernost uporabe metode ELFA z analizatorjem miniVIDAS ter jo primerjati z metodo CLIA, ki se že več let rutinsko izvaja na analizatorju Liaison. Poskušali smo ugotoviti, ali je metoda ELFA, izvedena z analizatorjem miniVIDAS, primerljivo občutljiva in specifična.

Za namen diplomske naloge smo analizirali zaporedne vzorce 109 bolnikov, ki so bili v laboratorij poslani zaradi suma na akutno okužbo z virusom EBV. Več vzorcev (59,6 %) je pripadalo pacientom ženskega spola. Glede na starost preiskovancev, vključenih v nalogi, so bili najpogosteje testirani preiskovanci med 25 in 50 letom (33,9 %). Okužba z virusom EBV se najpogosteje pojavlja v otroštvu, kot tipična klinična slika infekcijske monukleoze pa pri adolescentih in mlajših odraslih. Glede na omejitve metode določanja heterofilnih protiteles smo pričakovali, da bo v rutinski diagnostiki večina vzorcev spadala v najnižjo starostno skupino oziroma bodo najpogostejši vzorci predšolskih otrok. Izkazalo se je, da so pregledovani vzorci pogosteje pripadali bolnikom med 25 in 50 letom. Iz izkušenj laboratorija domnevamo, da je večina vzorcev na klinikah ali v zdravstvenih domovih že pregledana na prisotnost heterofilnih protiteles in naši vzorci večinoma pripadajo skupini bolnikov, ki nimajo dokazljivih heterofilnih protiteles. Razlog za negativen test na heterofilna protitelesa je lahko nizka starost bolnika (do pet let) ali pa testiranje bolnika v zelo zgodnji fazi okužbe, ko bolniki še ne razvijejo heterofilnih protiteles.

S primerjavo analiznih rezultatov specifičnih protiteles VCA IgM med testoma miniVIDAS in Liaison smo ugotovili skladne rezultate pri 20 pozitivnih vzorcih (18,3 %) in 77 negativnih (70,6 %). Rezultati so bili torej skladni pri 97 preiskovanih vzorcih (89,0 %) in neskladni pri 12 (11,0 %) vzorcih.

Za specifična protitelesa VCA/EA IgG smo s testom Liaison in miniVIDAS dokazali skladnost pri 91 pozitivnih vzorcih (83,5 %) in 12 negativnih (11,0 %). Ujemanje pri obeh testih je bilo pri 103 (94,5 %) vzorcih in neujemanje pri šestih (5,5 %) vzorcih.

Za specifična protitelesa EBNA IgG smo z obema testoma ugotovili ujemanje pri stotih (91,7 %) in neujemanje pri devetih (8,3 %) vzorcih. Skladnost smo ugotovili pri 72 (66,1 %) pozitivnih, 28 (25,7 %) negativnih in dveh (1,8 %) mejnih rezultatih.

S primerjavo rezultatov smo ugotovili, da se med metodama najbolj ujemajo rezultati prisotnosti protiteles razreda IgG, usmerjenih proti antigenu VCA oz VCA/EA (sistem miniVIDAS), in sicer v 94,5 % primerov. Tudi primerjava ujemanja rezultatov za testiranje IgG, usmerjenih proti antigenom EBNA, je pokazala visoko ujemanje (91,7 %) vseh testiranih vzorcev. Najslabše so se ujemali rezultati pri testiranju specifičnih protiteles razreda IgM, usmerjenih proti antigenu VCA, in sicer v 89 %. S primerjavo dveh testov za dokazovanje specifičnih protiteles proti antigenom virusa EBV smo ugotovili manjšo občutljivost vseh testov, ki smo jih uporabili za primerjavo (miniVIDAS). Razlike pa so bile pri testiranju ne glede na vrsto testiranih specifičnih protiteles proti EBV pod mejo petih odstotkov.

Ne glede na rezultate, ki smo jih dosegli pri testiranju posameznih specifičnih protiteles, usmerjenih proti antigenom virusa EBV, smo opravili tudi skupno interpretacijo izvida, v kateri smo poskusili glede na objavljene kriterije opredeliti status okužbe z EBV.

Pri primerjavi vrednotenih rezultatov statusa okužbe smo med metodama ugotovili skladnost interpretacije pri 103 pacientih (94,5 %), kar ocenujemo kot zelo dobro. Neujemanje posameznih parametrov testiranja namreč nima nobenih kliničnih posledic, če se ujema interpretacija stadija okužbe z EBV, ki je edina merodajna za postavitev diagnoze.

Serološko negativni status smo ugotovili skladnost pri osmih vzorcih (7,3 %). Pričakovano je, da so ti vzorci brez specifičnih protiteles proti virusu EBV pripadali osebam, mlajšim od 25 let.

Čeprav smo testirali razmeroma majhno število serumskih vzorcev, sklepamo, da je prekužnost z virusom EBV pri osebah, starih nad 25 let, v pregledani populaciji praktično univerzalna in njihovo testiranje v rutinski diagnostiki za dokaz akutne okužbe najbrž ni smiselno.

Primarno, akutno ali zgodnjo akutno okužbo z virusom EBV smo po interpretaciji serološkega statusa opredelili pri 15 (13,8 %) vzorcih. Večina pacientov je spadala v starostno skupino do 25 let, kar ustreza opisom v literaturi, saj je to najbolj ogrožena starostna skupina za primarno in simptomatsko okužbo z EBV.

Pri petih (4,6 %) vzorcih nismo mogli določiti statusa okužbe, zato smo jih na podlagi interpretacijske sheme uvrstili v nedoločen profil. Tak izvid je za klinično delo nezaželen in ga običajno poskušamo pojasniti s ponovnim odvzemom vzorca in testiranjem tako imenovanega parnega seruma, testiranjem z metodo imunoblot ali IFA, ki natančno opredeli antigene oziroma protitelesa in status okužbe z EBV.

Leta 2011 so raziskovalci iz Medicinske univerze v Gradcu v Avstriji objavili primerjavo rezultatov metode miniVIDAS in IFA (indirektna imunfluorescencija). Za EBV specifično serološko analizo pri imunsko oslabljenih pacientih so uporabili IFA, encimsko imunsko analizo (miniVIDAS) in *Western blot* metodo. V tej študiji so primerjali novo avtomatsko analizno metodo za dokazovanje EBV specifičnih protiteles z referenčno serološko diagnostično EBV metodo v rutinskih pogojih uporabe (29).

V diplomski nalogi smo ugotovili negativni status akutne okužbe pri 70 (64,2 %) vzorcih, pri raziskavi izvedeni v Gradcu pa jih je bilo 65 (37,3 %). Za serološko negativne vzorce smo opredelili skladnost pri osmih (7,3 %) vzorcih, kar so v raziskavi dokazali pri 26 (14,9 %) vzorcih. Status primarne okužbe smo dokazali skladnost pri 15 (13,8 %) vzorcih, kar so pri tuji raziskavi določili pri 48 (27,6 %) vzorcih. Pri petih (4,6 %) skladnih vzorcih smo opredelili kot nedoločljiv profil, v tuji raziskavi so skladnost dokazali za 27 (15,5 %) vzorcev.

V laboratoriju, kjer sem izvajala diplomsko nalogo, za dokaz protiteles proti EBV ne izvajajo metode IFA, tako naših rezultatov žal ni mogoče neposredno primerjati z rezultati, ki jih je opravila raziskovalna skupina iz Gradca. Za razjasnitev vzorcev z ne ujemajočimi rezultati pa bi lahko uporabili metodo imunoblot, ki pa v laboratoriju ni rutinska metoda in je povezana s precejšnjimi dodatnimi stroški.

## 7 SKLEPI

V študijo dokazovanja specifičnih protiteles proti virusu EBV smo vključili 109 zaporednih serumskih vzorcev pacientov.

S primerjavo dveh seroloških metod za dokaz specifičnih protiteles proti antigenom virusa EBV smo ugotovili, da sta metodi na ravni posameznih določanih vrst protiteles primerljivi.

Še boljše ujemanje smo dosegli, ko smo namesto posameznih parametrov primerjali skupno interpretacijo določitve statusa okužbe.

Kljub temu, da sta bila v testu miniVIDAS združena parametra VCA IgG in EA IgG, to ni bistveno vplivalo na interpretacijo stadija okužbe.

Zaradi visoke občutljivosti menimo, da je metoda miniVIDAS primerna za diagnostiko okužb z virusom EBV v laboratorijih, kjer nimajo velikega števila dnevno testiranih vzorcev.

## 8 LITERATURA

1. **Sample JT, Sample CE.** P: Epstein-Barr virus: molecular biology. V: Mahy W JB, Van Regenmortel H VM. *Encyclopedia of virology*. Elsevier, Amsterdam, 2008: 157-167.
2. **Reberšek GJ, Baklan Z, Kotnik KB.** *Okužbe s humanimi herpesvirusi: Zbornik predavanj in praktikum*. Bedjaničev simpozij. Maribor, 1999: 75-115.
3. **Murray PR, Baron EJ, Jorgensen HJ, Landry LM, Pfaller AM.** *Manual of Clinical microbiology*. American Society for Microbiology. Washington, 2007: 1567-1570.
4. **Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA.** *Medical microbiology*. Mosby. St. Louis, 1998: 419-433.
5. **Rickinson AB, Kief E.** P: Epstein-Barr Virus. V: Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 2657-2688.
6. **Young SL.** P: Epstein-Barr virus: general features. V: Mahy W JB, Van Regenmortel H VM. *Encyclopedia of virology*. Elsevier, Amsterdam, 2008: 148-157.
7. **Likar M.** P: *Klinična virologija za medicince*. Medicinska univerza Edvarda Kardelja. Ljubljana, 1987: 173-189.
8. **Tselis A, Jenson HB.** *Epstein-Barr virus: Infectious disease and therapy*. Taylor & Francis Group. New York, 2006: 21-31.
9. **Koren S, Marin J.** P: Razmnoževanje virusov. V: Koren S, Avšič Županc T, Drinovec B, Marin J, Poljak M. *Splošna medicinska virologija*. Medicinski razgledi. Ljubljana, 2007: 23-34.
10. **Marin J.** J: Prispevek k spoznavanju vloge virusa Epstein-Barr v Sloveniji. *J Zdravniški vestnik* 1990; 59: 405-8.
11. **Davison AJ.** P: Comparative analysis of genomes. V: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore SP, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K. *Human Herpesviruses: Biology, therapy and immunoprophylaxis*. Cambridge University press. Cambridge, 2007: 27-43.

12. **Crawford DH.** P: Epstein-Barr virus. V:Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD, Schoub BD. *Principle and practice of clinical virology*. John Wiley & Sons. West Sussex, 2004: 123-144.
13. **Chandran B, Hutt-Fletcher L.** P: Gammaherpesviruses entry and early events during infection V: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore SP, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K. *Human Herpesviruses: Biology, therapy and immunoprophylaxis*. Cambridge University press. Cabridge, 2007: 360-378.
14. **Lieberman PM, Hu J, Renne R.** P: Maintenance and replication during latency. V: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore SP, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K. *Human Herpesviruses: Biology, therapy and immunoprophylaxis*. Cambridge University press. Cabridge, 2007: 379-402.
15. **Longnecker R, Neipel F.** P: Introduction to the human gammaherpesviruses. V: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore SP, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K. *Human Herpesviruses: Biology, therapy and immunoprophylaxis*. Cambridge University press. Cabridge, 2007: 341-359.
16. **Means ER, Lang MS, Jung UJ.** P: Human gammaherpesviruses immune evasion strategies. V: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore SP, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K. *Human Herpesviruses: Biology, therapy and immunoprophylaxis*. Cambridge University press. Cabridge, 2007: 559-588.
17. **Vozelj M.** *Temelji Imunologije*. DZS d.d. Ljubljana, 2000: 16.
18. **Strauss HJ, Strauss GE.** *Viruses and human disease*. Elsevier. Amsterdam, 2007: 289-293.
19. **Crawford DH, Epstein MA.** P: The Epstein-Barr virus. V: Warrell AD, Cox MT, Firth DJ, Benz Jr MD. *Oxford Textbook of Medicine*. Oxford Press. UK, 2003: 341-345.
20. **Storch AG.** P: Infectious Mononucleosis. V: Storch AG. *Essentials of diagnostic virology*. Churchill Livingstone. USA, 2000: 160-165.
21. **Cohen JI.** P: Epstein-Barr virus infections, including infectious mononucleosis. V: Kasper DL, Fauci AS. *Harrison's Infectious Diseases*, McGraw Hill Medical, New York, 2010: 748-749.

- 22.** Hess DR. J: Routine Epstein-Barr Virus Diagnostic from Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 years. *J Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 3381-3387.
- 23.** DiaSorin LIAISON. 2011. DiaSorin LIAISON EBNA IgG. 2011. (310520) EN-200/007-839.
- 24.** VIDAS ® bioMérieux, EBNA IgM. 2009. VIDAS ® EBV EBNA IgM (EBNA) bioMérieux. REF 30 235
- 25.** VIDAS ® bioMérieux, VCA/EA IgG. 2009. VIDAS ® EBV VCA/EA IgM (VCAG) bioMérieux. REF 30 236
- 26.** VIDAS ® bioMérieux, VCA IgM. 2009. VIDAS ® EBV VCAIgM (VCAM) bioMérieux. REF 30 236
- 27.** Klutts JS, Ford BA, Perez NR, Gronowski AM. J: Evidence-based approach for interpretation of Epstein-Barr virus serological patterns. *J American Society for Microbiology* 2009; 47: 3204-3210.
- 28.** Avšič Županc T. P: Posredno dokazovanje virusov. V: Koren S, Avšič Županc T, Drinovec B, Marin J, Poljak M. *Splošna medicinska virologija*. Medicinski razgledi. Ljubljana, 2007: 120-121.
- 29.** Koidl C, Riedl R, Schweighofer B, Fatt S, Bozic M, Marth E. J: Performance of new enzyme-linked fluorescent assay for detection of Epstein-Barr virus specific antibodies in routine diagnostic. *J Wien Klin Wochenschr* 2011; 123: 230-234.